

**Serologische Untersuchungen
über die Verbreitung der
BVD/MD-Virusinfektion bei Nicht-Rindern
in Nordbayern**

Reinhard Holweg

Disbui. München
1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen
Nordbayern, Nürnberg (Präsident: Dr. Schmittdiel)
Arbeit angefertigt unter Anleitung von
Leitenden Veterinärdirektor Dr. K. Bauer

Vorgelegt über das Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Anton Mayr

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERBREITUNG
DER BVD/MD-VIRUSINFEKTION BEI NICHT-RINDERN IN
NORDBAYERN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Reinhard Holweg

aus

Heroldsberg

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr
Koreferent: Priv.Do. Dr. Dr. habil. R. Stolla

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

In Dankbarkeit
meiner Ehefrau Anke
und meinen Eltern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	9
2. <u>Literatur</u>	10
2.1. Schaf	10
2.2. Ziege	21
2.3. Schwein	24
2.4. Andere Spezies	29
3. <u>Eigene Untersuchungen</u>	34
3.1. Material und Methoden	34
3.1.1. Blut- bzw. Serumproben	34
3.1.2. Zellkultur	35
3.1.2.1. Herstellung primärer BEL-Zellkulturen	35
3.1.2.2. Zellzählung und Zellanzüchtung	36
3.1.2.3. Vermehrung von BEL-Zellen	38
3.1.2.4. Einfrieren und Lagern von BEL-Zellen	38
3.1.3. Virusstämme und deren Vermehrung	39
3.1.4. Mikroneutralisationstest	40
3.1.5. Titerberechnung	43
3.1.6. Neutralisations- und Immunofluoreszenztest (NIF-Test) für Schweineseren auf ESP	43
3.2. Ergebnisse	44
3.2.1. Positive Reagenten im NT und Titerhöhen	44
3.2.2. Räumliche Verteilung der positiven Reagenten	47
3.2.3. Beziehung zu Verwerfensfällen	50
4. <u>Diskussion</u>	54
4.1. Allgemeines	54
4.2. Schaf und Ziege	57
4.3. Schwein	58
5. <u>Zusammenfassung</u>	60
<u>Summary</u>	61
6. <u>Lösungen und Medien</u>	62
6.1. PBS-Lösung	62
6.2. AB-PBS-Lösung	62
6.3. PBS-Trypsin-Lösung (0,25 %-ig)	62

	Seite
6.4. STV-Lösung	62
6.5. Hanks-Lösung	62
6.6. LAH-Lösung	63
6.7. Eagles MEM	63
6.8. AZM bzw. EHM	64
6.9. $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ -Puffer (pH 9) zum Eindeckeln	64
7. <u>Abkürzungen</u>	65
8. <u>Literaturverzeichnis</u>	66

1. Einleitung:

Über die Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease-(BVD/MD)-Virusinfektion beim Rind sind seit ca. vier Jahrzehnten zahlreiche Arbeiten erschienen. Sucht man jedoch Literatur über diese Infektion bei anderen Tierarten, so fällt auf, daß relativ wenig berichtet wird.

Der größte Anteil der Veröffentlichungen bezieht sich dabei auf Infektionen bei Schafen und Schweinen. Darunter sind nur wenige Beschreibungen aus der Bundesrepublik Deutschland. Ob dieser Umstand nun an der geringen Verbreitung des BVD/MD-Virus in der Bundesrepublik oder an den geringen wirtschaftlichen Schäden liegt, bleibe in Frage gestellt.

Es wäre deshalb von Interesse die Verbreitung der BVD/MD-Virusinfektion bei Wiederkäuern, Schweinen, aber auch bei Wildtieren in der Bundesrepublik Deutschland kennenzulernen. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten und befaßt sich mit dem Vorkommen der BVD/MD-Infektion bei Schafen, Ziegen und Schweinen in Nordbayern.

2. Literatur:

2.1. Schaf:

Mit der erstmaligen Beschreibung einer Erkrankung, die mit eigenartig langer gekräuselter Wolle, schwarzem Haar am Rücken und Nacken, geringem Geburtsgewicht, Wachstumsdepression und kurzen dünnen Röhrenknochen einhergeht, begann die intensive Erforschung einer Infektionskrankheit bei Schafen, die Hughes et al. (1959) in Großbritannien als "B" oder "Border Disease" (BD) bezeichneten, da sie an der Grenze zwischen England und Wales auftrat.

Die Ätiologie war zu diesem Zeitpunkt noch ungeklärt. Als weitere Symptome wurden beschrieben: Hervorragende Stirnpartie; Bewegungsanomalien, die sich durch leichtes Schwanken und Zurückbleiben in der Herde äußerten; Zittern unterschiedlicher Intensität vor allem in der Hinterhand, was die Lämmer zum Teil hinderte zu saugen; hohe Mortalität vor allem während der ersten Lebenswochen bis zum Absetzen; Myelinmangel im gesamten Zentralnervensystem (ZNS) bei Lämmern mit Ataxie, wobei die Axone intakt waren.

Das letztgenannte Symptom beschrieben ebenfalls Markson et al. (1959) in Großbritannien anhand einiger Fälle zwischen 1955 und 1958 und bezeichneten diese Erkrankung als "Hypomyelinogenesis congenita". Leider gaben diese Untersucher keinerlei Hinweise auf weitere Symptome wie z. B. die Vliesbeschaffenheit.

Im Rahmen einer Untersuchung über ZNS-Erkrankungen bei Schafen in Neuseeland berichteten Hartley und Kater (1962) von einem angeborenen Myelinmangel verbunden mit Zittern und Ataxien, Wachstumsdepression und haarigem Vlies.

Sieben Jahre später wird dieses Syndrom von ihren Landsleuten Manktelow et al. (1969) aufgrund der zitternden Vliesbewegungen als "Hairy Shaker Disease" bezeichnet.

Weitere Beschreibungen der "Border Disease" folgten über die gesamte Welt verteilt:

Vereinigte Staaten von Amerika (kurze Darstellung durch Bell als "fuzzy lambs" - 1967; Osburn et al. - 1972)

Irland (Hamilton und Donnelly - 1970)

Australien (Hore et al. - 1973)

Schweiz (Fankhauser et al. - 1974)

Griechenland (Spais et al. - 1975)

Kanada (Physick-Sheard et al. - 1980)

Norwegen (Løken und Barlow - 1981)

Bundesrepublik Deutschland (Liess et al. - 1982)

Syrien (Wilsmore und Roeder - 1984)

Frankreich (Brugère-Picoux et al. - 1984).



Die Übertragbarkeit der BD wiesen Dickinson und Barlow (1967) nach. Es gelang ihnen nach Verabreichung von verdächtigem Material an trächtige Schafe BD-krankte Lämmer zu erzeugen. Dies wurde durch Shaw et al. (1967) bestätigt, wobei diese Verfasser Angaben über den Inokulationszeitpunkt trächtiger Tiere mit den entsprechenden Folgen machten.

Heute wird das Virus wie folgt eingeordnet: einsträngiges behülltes RNS-Virus der Familie "Togaviridae", Genus "Pestivirus" (Matthews 1979).

Eine intrauterine Infektion des Fötus vermutete Gardiner (1967) nach Vergleich der unterschiedlichen elektrophoretischen Muster prä- bzw. postkolostraler Seren von infizierten und gesunden Lämmern mit denen der jeweiligen Muttertiere. Jedoch konnten Patterson und Sweasey (1969) und Barlow et al. (1970) nur in sehr wenigen präkolostralen Lammseren IgG-Antikörper (7s-Gamma-Globulin) nachweisen, was möglicherweise mit der noch nicht ausgereiften Immunkompetenz der Föten (Inokulationszeitpunkt 20. bzw. 54. Trächtigkeitstag) zusammenhing. Barlow und Gardiner (1969) diskutierten, ob dieses Gamma-Globulin spezifischen Charakters sei oder indirekt als Reaktion auf Antigene aus Gewebszerstörungen entstünde.

1969 veröffentlichten Shaw et al. erfolgreiche Ergebnisse

von Vakzinierungsversuchen mit noch wenig aufbereitetem Material. In diesem Jahr führten Lewis et al. (1970) Infektionsversuche mit Tieren aus Manktelows Experimenten (1969) und Schafen ohne bisheriger BD-Vorgeschichte durch, wobei sie feststellten, daß die durch Infektion erworbene Immunität belastbarer als von Shaw et al. (1969) beschrieben und scheinbar abhängig vom inokulierten Material war. Erstmals gelang ihnen die Infektion auf oralem und konjunktivalem Wege. Später wurde nachgewiesen, daß das BD-Agens per contact übertragen (Hamilton und Timoney 1972, 1973) und mindestens 22 Monate lang von immuntoleranten Tieren ausgeschieden wird, welche als "hairy lambs" das Hauptreservoir darzustellen scheinen (Plant et al. 1976 a, b, 1977; Gard et al. 1976; Westbury et al. 1979; Sawyer et al. 1983).

Das Krankheitsbild der BD konnte durch Infektion der Muttertiere zwischen dem 16. und 120. Trächtigkeitstag ausgelöst werden (Manktelow et al. 1969; Gardiner und Barlow 1972). Andere Untersucher konnten die Erkrankung am 118. Trächtigkeitstag nicht auslösen (Jackson et al. 1972).

Daß das BVD/MD-Virus des Rindes eine Rolle bei Schafen spielen könnte, zeigten schon Antikörper(AK)-Nachweise in den 60er Jahren. Durch experimentelle Infektionen trächtiger Schafe mit zwei BVD/MD-Virusstämmen (NADL; Studdert 8610) konnte Ward (1971) Mummifikation, Aborte, Totgeburten, Veränderungen am Gehirn (Hydrocephalus, Kleinhirnhypoplasie) und Schwäche an den Hintergliedmaßen auslösen, was neues Licht auf das BD-Geschehen warf. Weitere Hinweise, wonach das Virus der BVD/MD eine bedeutende Rolle bei der BD-Infektion spiele, gaben Acland et al. (1972) und Hamilton und Timoney (1972, 1973). Von einer MD-Virusisolierung und Identifizierung mittels Interferenztest aus der Leber eines Lammes, das kurz nach seiner Geburt starb, berichteten Hore et al. (1973) und unterstützten Vermutungen (St. George 1971), daß dem Kontakt zwischen Rindern und Schafen große epidemiologische Bedeutung zukäme. Die experimentelle Übertragung vom Rind auf das Schaf zeig-

ten French et al. (1974). Die BVD/MD-Virusinfektion bei Schafen sahen diese Untersucher nicht als eine Sackgasse an, sondern vielmehr als Virusreservoir, was zu einer Reinfektion vom Schaf auf das Rind führen könne (zu gleichen Ergebnissen kamen auch Gibbons et al. 1974 und Snowdon et al. 1975).

Eine immunologische Verwandtschaft zwischen BD-, BVD/MD- und Europäischem Schweinepest(ESP)-Virus wurde von Plant et al. (1973) postuliert. Sie verwendeten hierzu den Agar-Gel-Immun-Diffusionstest. Entsprechende Ergebnisse erzielten Osburn et al. (1973) mit dem Radialen Immun-Diffusionstest (quantitativer IgG-Nachweis) und dem Neutralisationstest (NT).

Erfolgreiche Infektionsversuche mit zellfreien, penicillin- und streptomycinbehandelten Infiltraten (Gardiner und Barlow 1972) und die nähere Charakterisierung des BD-Agens (Gardiner et al. 1972) führten zu folgender Darstellung: Es handelt sich um ein äther- und hitzelabiles (60°C für 90 Minuten) einsträngiges RNS-Virus, welches nach Filtration durch Poren von 50 nm Durchmesser noch infektiös ist. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen schon Hermodsson und Dinter (1962) und später auch Vantsis et al. (1976). Elektronenmikroskopische Untersuchungen des BVD/MD-Virus lassen auf eine Größe zwischen 50 und 60 nm schließen (Mahnel 1984). Wie bereits erwähnt wird das BD-Virus in die Familie der "Togaviridae" Genus "Pestivirus" eingeordnet (Matthews 1979).

Aufgrund von Beobachtungen und Versuchen müssen verschiedene Stämme des BD-Virus bestehen (Porter et al. 1972; Vantsis et al. 1979; Barlow et al. 1979; Plant et al. 1983), welche auch unterschiedliche immunisierende Eigenschaften haben, so daß für einen ausreichenden Schutz ebenfalls verschiedene Stämme in Vakzinen verwendet werden sollten (Vantsis et al. 1980 a, b).

Das klinische und pathologische Bild der BD-Infektion bei Mutterschafen und Lämmern bzw. Föten variiert je nach Virusstamm (Weavers et al. 1975; Snowdon et al. 1975; Plant et al. 1976 a, b), wobei der Hauptvermehrungsort des Virus die Pla-

zenta (Snowdon et al. 1975; Zakarian et al. 1975) und/oder undifferenzierte ZNS-Zellen (Potts et al. 1982) zu sein scheinen, Infektionszeitpunkt und Genotyp des Schafes (Barlow et al. 1979). Scheinbar ist der Grad der Erkrankungssymptome auch abhängig von der inokulierten Virusdosis, wenn nicht linear, dann zumindest stufenweise (Richardson et al. 1976).

Daß das BD-Virus auch mit dem Samen übertragen werden kann, bewiesen Gardiner und Barlow (1981), als sie Samen von infizierten Böcken künstlich übertrugen bzw. diese mit der Versuchsherde laufen ließen und so BD-Lämmer erhielten. Weiter noch vermuteten sie, daß Virus im Scheiden- oder Uterusgewebe, trotz maternaler AK-Bildung, über mindestens 32 Tage überleben und so eine fötale Infektion in späteren Trächtigkeitsstadien verursachen könnte.

Neben der Immuntoleranz diskutierte man eine Unterdrückung der Plasmazellentwicklung, so daß es zu einer generellen Verminderung der Immunabwehr komme (Terpstra 1981). Beim adulten Tier beobachtete man nach einer BVD-Virusinfektion neben kaum merkbaren klinischen Symptomen eine gewisse Immunsuppression (Salsbury 1985). Auf welche Weise das körpereigene Abwehrsystem auch geschädigt werden mag, Folge wird immer eine Häufung von Sekundärinfektionen innerhalb einer Herde sein. Neben Bronchopneumonien sah man vor allem lympho-proliferative Veränderungen im Darm und im ZNS (Barlow et al. 1983).

Serologische und virologische Untersuchungen führten zur Annahme, daß sich immuntolerante Tiere in einem Gleichgewichtszustand mit dem Virus befänden, der sich nach bestimmten antigenetischen Merkmalen ausrichtete. Nach Reinfektion mit dem gleichen Antigen käme es zum Ausbruch der Krankheit (Gardiner et al. 1983).

Untersuchungen auf Antikörper gegen BVD/MD- bzw. BD-Virus in Schafseren führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. So beschrieb Bögel (1964) den Nachweis von MD-Virus neutralisierenden Antikörpern in Seren aus Süddeutschland. Im Plättchentest waren 37,6 % von 314 Schafseren aus 17 Herden positiv.

Dabei stieg die Anzahl der positiven Reagenten mit dem Alter. Vergleichend hierzu reagierten knapp 20 Jahre später im NT mit dem MD-Virusstamm "NADL" als Testvirus 60,3 % der Tiere aus zwölf nordhessischen Schafherden bei einer Serumverdünnung von $\geq 1 : 5$ positiv (Becker 1983).

1964 ergab eine australische Untersuchung im NT mit dem MD-Virusstamm "Oregon C 24 V" 16 % positive Reagenten, wobei die Seren zunächst unverdünnt getestet wurden. Die nachfolgende Titration einiger Seren ergab Werte meist unter $1 : 100$ (French und Snowdon 1964). Unter den gleichen Testbedingungen bei einer Serumverdünnung von $\geq 1 : 5$ kam man bei einem Survey mit Schafseren aus nahezu allen australischen Staaten zu folgendem Ergebnis: 8,2 % der Tiere hatten MD-Virus-Antikörper, wobei die Zahl positiver Reagenten mit zunehmendem Alter anstieg, rassen- und staatenabhängige Schwankungen bestanden und auf Farmen mit Rindern deutlich mehr positive Schafseren nachweisbar waren (St. George 1971).

28 % positive Reagenten im NT mit einem Vakzinestamm des BVD-Virus ("Bovax") bei einer Serumverdünnung von $\geq 1 : 8$ ergaben sich im Zuge einer neuseeländischen Studie (Robinson 1971).

Aus den USA kamen erstmals 1967 Berichte über Antikörper gegen MD-Virus in Schafseren, die als Zusatz zum Wachstumsmedium für Lammhodenzellen gebraucht wurden (Seibold und Dougherty 1967). Zwischen 98 % der untersuchten Schafseren in Süd-Idaho und 0 % in Ost-Oregon und Washington reagierten positiv gegen ein BD-Virus (Evermann et al. 1981).

In den Niederlanden wies man in 16 aus 58 Schafbetrieben BVD-Antikörper nach. In diesen BVD-positiven Betrieben reagierten 25 % der Tiere gegen das verwendete Virus, im Gesamtdurchschnitt 5 % (anonym aus dem Centraal Diergeneeskundig Instituut - Lelystad 1976).

Im Immundiffusionstest hatten 10,8 % von 3506 Schafseren aus 195 englischen und walisischen Schafherden AK gegen BVD/MD-Virus. Das Ergebnis in den einzelnen Regionen war sehr unterschiedlich: Es reichte von 2,9 % im Norden bis 21,8 % in den

West-Midlands. In 37,4 % der Herden traten AK auf. Etwa doppelt so viele erwachsene Tiere verglichen mit jungen Schafen (bis 18 Monaten) wiesen AK gegen das BVD-Virus auf (Sands und Harkness 1978).

Von 460 Serumproben aus vier BD-infizierten Schafherden in Norwegen waren 47 % im NT mit dem BVD-Virusstamm "NADL" bei einer Serumverdünnung von $\geq 1 : 2$ positiv (Løken et al. 1982 b). In den einzelnen Herden wies man bei 14 %, 28 %, 54 % und 96 % der Tiere AK nach.

Adair et al. (1984) zeigten in 11 % einheimischer (nordirischer) bzw. 53 % fremder Schafrassen AK gegen einen BVD-Virus-Feldstamm im Immunofluoreszenztest. Dabei traten in 32,6 % bzw. 69 % der Herden AK-Träger auf, was mit der Studie von Sands und Harkness (1978) in Bezug auf die einheimischen Rassen gut übereinstimmte.

In Nordsyrien reagierten 74 % der erwachsenen Schafe und 53 % der Lämmer serologisch positiv gegen den "NADL"-Stamm des BVD-Virus (Wilsmore und Roeder 1984).

Bei einer Übersichtsuntersuchung kanadischer Schafseren traten bei 10,9 % der Schafe AK gegen den BVD-Virusstamm "NADL" im NT auf, wobei kein Zusammenhang zwischen Alter, Rasse, Geschlecht und Abortgeschehen in der jeweiligen Herde bestand (Lamontagne und Roy 1984). Einen höheren Durchseuchungsgrad kanadischer Schafe wiesen Elazhary et al. (1984) nach.

Die nachfolgende Tabelle 2.1./1 gibt zusammenfassend den Nachweis von BVD/MD- bzw. BD-Antikörpern wieder.

Tab. 2.1./1 Nachweis von BVD/MD- bzw. BD-Antikörpern:

Land	Methode	% pos. Reagenten	Verfasser
BRD	Plättchentest	37,6	Bögel (1964)
Australien	NT	16	French und Snowdon (1964)
Australien	NT	8,2	St. George (1971)
Neuseeland	NT	28	Robinson (1971)

Land	Methode	% pos. Reagenten	Verfasser
Niederlande	NT	5	Centraal Diergen. Inst. (1976)
Großbritannien	Immundiffusionst.	10,8	Sands und Harkness (1978)
USA	NT	0 - 98 (regional unterschiedlich)	Evermann et al. (1981)
Norwegen	NT	47 (BD-pos. Herden)	Løken et al. (1982 b)
BRD	NT	60,3	Becker (1983)
Nordirland	Immuno-fluoreszenztest	11 (einheim. Rassen) 53 (fremde Rassen)	Adair et al. (1984)
Nordsyrien	NT	74 (adulte Schafe) 53 (Lämmer)	Wilsmore und Roeder (1984)
Kanada	NT	10,9	Lamontagne und Roy (1984)
Kanada	Immuno-fluoreszenztest	0 - 55,2 (regional unterschiedlich)	Elazhary et al. (1984)

Eine erste Festlegung diagnostischer Kriterien stellten Barlow und Dickinson (1965) auf. Nach ausführlichen neuropathologischen und -histologischen Studien unter Einbeziehung früherer Erkenntnisse spreche für BD:

- 1) abnormal pigmentiertes haariges Geburtstvlies;
- 2) Verminderung von Wachstum und Lebensfähigkeit der Lämmer einer Herde ohne offensichtliche Gründe und/oder Auftreten von Lämmern mit rhythmisch-klonischen Krämpfen;
- 3) Nachweis von Myelindefekten und Herde mit angeschwollenen interstitiellen Gliazellen bei Lämmern unter sechs Monaten; Bei älteren Tieren ist zu bemerken, daß sich diese Symptome abschwächen, jedoch viele veränderte Gliazellen auch ohne Myelindefekte wichtige Hinweise geben.

Über gesteigerte Mortalität, vermindertes Geburtsgewicht und geringere Fruchtbarkeit aufgezogener Lämmer schrieben Nott und Shaw (1967). Von Unfruchtbarkeit (Fruchtresorption), Aborten und Mumifikation berichteten Dickinson und Barlow (1967), Manktelow et al. (1969) und Barlow und Gardiner (1969). Weitere detaillierte Angaben zur Pathologie der BD-

Lämmer wurden in den nachfolgenden Jahren gemacht: Ventrikeldilatation, kleine Zysten in der Weißen Substanz des Gehirns, interstitielle Lipidansammlungen (Myelinvorstufen?) (Barlow und Gardiner 1969); röntgenologisch aufgelockerte Knochenstrukturen (Terlecki et al. 1973); Kleinhirnhypoplasie (Plant et al. 1976 a).

Ob es sich bei den Myelinveränderungen um Hypomyelinogenese oder um Demyelinisierungsvorgänge handelte, wurde in vielen Studien diskutiert (Patterson und Sweasey 1970; Storey und Barlow 1972; Patterson et al. 1975) bis es nach elektronenmikroskopischen Vergleichen von Nervengewebe gesunder und BD-affizierter Lämmer Barlow und Storey (1977 a, b) gelang die verminderte Myelinbildung nachzuweisen.

Knotenförmige Entzündungen kleiner Arterien und Arteriolen im ZNS nach Infektion ab dem 80. Trächtigkeitstag sollen durch eine zellvermittelte Allergie vom Spättyp (Typ IV) entstehen (Zakarian et al. 1975, 1976; Gardiner et al. 1980). Dies scheint insofern vorstellbar, da eine Immunantwort des Foetusses ab dem 64. bis 82. Trächtigkeitstag möglich ist (Fahey und Morris 1978). Ähnliche Beobachtungen bis hin zu ausgedehnten entzündlichen Prozessen (Encephalomyelitis) machten Clarke und Osburn (1978) bei 50 bis 100 Tage alten Föten nach direkter Inokulation virushaltigen Materials in dieselben. Andere Versuchsreihen offenbarten keine entzündlichen Veränderungen (Barlow und Patterson 1982).

Das haarige Vlies entsteht durch das Überwiegen markhaltiger Primärfollikel, deren Entwicklung mit ca. 60 Tagen der Trächtigkeit abgeschlossen ist (Carter et al. 1972). Bis zu diesem Zeitpunkt haben sich die Veränderungen in den myelinhaltigen Anteilen des ZNS ebenfalls manifestiert (Patterson et al. 1971), was für ein Einwirken des pathogenen Agens auf das Ektoderm während des ersten Drittels der Trächtigkeit spricht.

Andere Untersucher konnten Vliesveränderungen bis zum 80. Trächtigkeitstag auslösen und diskutierten eine immunologi-

sche Antwort der Haut (Derbyshire und Barlow 1976).

Weitere diagnostische Kriterien stellen nach Barlow (1972 b) die relative Anzahl markhaltiger Wollfasern und Gliazellen pro Fläche dar, welche bei quantitativen Untersuchungen bei mehr als 37 % bzw. 267 Gliazellen/0,0575 mm² in BD-Lämmern lagen. Plant et al. (1976 a) gaben 1300 bis 2500 Gliazellen/mm², Gard et al. (1976) 1084 Gliazellen/mm² an. Die Erhöhung der Gliazellen war noch bei dreieinhalbjährigen Tieren signifikant.

Hypocupraemie als eine mögliche Ursache des haarigen Vlieses diskutierten Patterson et al. (1973, 1974, 1975), was jedoch anhand eingehender Untersuchungen anderer nicht bestätigt werden konnte (Barlow et al. 1976; Plant et al. 1976 a; Sansom et al. 1979).

Infizierte man neugeborene Lämmer, kam es zu folgenden Veränderungen: nach intramuskulärer (i. m.) Inokulation - Verlangsamung der Wachstumsrate ohne andere Anzeichen; nach intracranialer Inokulation - Entstehung einer nichteitrigen Encephalitis, wobei die Weiße Substanz des Großhirns der Hauptangriffsort zu sein schien (Roeder et al. 1983; Terlecki und Roeder 1983). Schafe und Lämmer, die nach überstandener BD reinfiziert wurden, zeigten lympho-proliferative Veränderungen vor allem an Darmabschnitten und im ZNS (Barlow et al. 1983).

Bei experimenteller Infektion von Mutterschafen mit einem Feldvirusstamm fand Barlow (1972 a) Läsionen an der Plazenta. Abhängig von der Trächtigkeitsdauer erkannte er Gewebsektosen in fötusnahen, großen Plazentomen nach Virusinfektion am 25. bis 30. Trächtigkeitstag oder solche die sich über die gesamten Plazentome in beiden Gebärmutterhörnern verteilten nach Virusinfektion am 54. Trächtigkeitstag.

Mit den wirtschaftlichen Folgen im Betrieb befaßt sich eine Arbeit von Sweasey et al. (1979). Demnach ist es unrentabel

betroffene Lämmer aufzuziehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die BD ein über die gesamte Welt verbreitetes Krankheitsbild zu sein scheint. Die Diagnose erweist sich nicht immer als leicht, da typische "hairy shakers" nur teilweise auftreten. So sind häufig aufwendige pathologische und virologische Untersuchungen notwendig, was jedoch nicht in jedem Labor möglich sein wird. Die genauen pathogenetischen und immunologischen Vorgänge im Muttertier bzw. im Fötus oder Lamm und die epidemiologischen Besonderheiten der BD versteht man bis dato noch nicht vollständig. So dauert es sicher noch einige Zeit bis optimale Bekämpfungs- bzw. Prophylaxemaßnahmen zur Verfügung stehen.

2.2. Ziege:

Im Rahmen eines Surveys über neutralisierende AK gegen den BVD/MD-Virusstamm "Oregon C 24 V" in Seren von Rindern, Schafen, Schweinen, Ziegen und Hirschen aus verschiedenen australischen Staaten zeigte sich, daß eine BVD/MD-Virusinfektion auch bei Ziegen vorkam, jedoch nicht weit verbreitet zu sein schien (French und Snowdon 1964).

Ziegen mit neutralisierenden AK gegen BVD-Virus wurden auch in Senegal (Bernard und Bourdin 1971), den USA (Cork et al. 1974; Fulton et al. 1982), Großbritannien (Huck et al. 1975), Japan (Shinizu und Furnuchi 1976), Nigeria (Taylor et al. 1977), Norwegen (Løken et al. 1982 a) und Kanada (Elazhary et al. 1984; Lamontagne und Roy 1984) ausfindig gemacht. Eine Zusammenstellung über die Verteilung neutralisierender AK zeigt Tabelle 2.2./1.

Tab. 2.2./1 Neutralisierende AK gegen BVD/MD-Virus bei Ziegen:

Land	% pos. Reagenten	Verfasser
Australien		French und Snowdon (1964)
Senegal	49-68 (regional unterschiedlich)	Bernard und Bourdin (1971)
USA		Cork et al. (1974)
Großbritannien		Huck et al. (1975)
Japan		Shinizu und Furnuchi (1976)
Nigeria	4,5	Taylor et al. (1977)
Norwegen	43 (Herde mit BD)	Løken et al. (1982 a)
USA	1,8 mit Titern $\geq 1 : 2$	Fulton et al. (1982)
Kanada	16 mit Titern $> 1 : 8$	Lamontagne und Roy (1984)
Kanada	0 - 21,3 (regional unterschiedlich) mit Titern $\geq 1 : 10$	Elazhary et al. (1984)

Lamontagne und Roy (1984) stellten bei ihrer Untersuchung keine signifikanten Unterschiede der AK-Verteilung bezüglich Alter, Geschlecht und Rasse fest.

Eine von drei am 54. Trächtigkeitstag mit BD-Virushaltigem Standardinokulum (gleiche Teile einer 1/200 verdünnten Gehirn- und Milzsuspension eines BD-erkrankten Lammes) infizierten Ziegen abortierte um den 90. Trächtigkeitstag (Gardiner und Barlow 1972).

In weiteren Experimenten zeichnete sich, verglichen mit der BD-Virusinfektion beim Schaf, ein ähnliches Krankheitsbild ab: nach Infektionen mit BD-Virushaltigem Material zwischen dem 21. und 60. Trächtigkeitstag kam es zu Unfruchtbarkeit, Aborten, Totgeburten, Lebensschwäche und Ataxie bei Lämmern (Huck 1973).

Trotz Passagen durch Ziegen blieb das BD- bzw. BVD-Virus noch pathogen für Schafe und Rinder (Huck 1957, 1973).

Ausführliche Studien von Barlow et al. (1975) umgrenzten das Krankheitsbild näher: neben den oben bereits beschriebenen Symptomen sah man ungewöhnlich zarte Röhrenknochen, kurzen Kopf mit übermäßig vorgewölbter Stirnpartie, Hypomyelinogenese und Hypergliosis im ZNS neugeborener Lämmer und nekrotisierende Karunkulitis. Unterschiede zum Schaf gab es im Zeitpunkt des Fruchttodes bzw. Abortes (unter den gleichen Bedingungen wie beim Schaf bei der Ziege 10 bis 15 Tage früher) und im Auftreten von "shakers" (nur eine von 15 Ziegen). Weiterhin fehlten IgG-AK in fötalen bzw. neugeborenen, präkolostralen Blutproben und es gab keine signifikanten Unterschiede in der Größe der Föten.

Veränderungen im Fell waren nur histologisch nachzuweisen, wobei BD-Kitze kleinere Primärfollikel hatten, von denen wiederum weniger bemerkt waren als bei Lämmern. Das Verhältnis sekundärer zu primärer Follikel schien bei diesen Kitzen geringer zu sein. Diese Resultate ähnelten im Großen und Ganzen denen von Scottish Blackface-Schafen mit langem rauhem Vlies (Orr und Barlow 1978).

Eine erste Pestivirusisolierung (durch Immunodiffusion) vom Kitz einer natürlich infizierten Ziege wurde von Fraser et al. (1981) aus Australien berichtet. Bis auf das dazugehörige Muttertier, welches noch nach einem halben Jahr präzipitierende AK hatte, wies man in keiner weiteren Ziege, die in Kontakt mit jenem war, AK gegen das BVD/MD-Virus nach. 1982 wurde das Auftreten von BD in norwegischen Ziegen beschrieben (Løken et al. 1982 a). 43 % der 91 Tiere aus einer Herde hatten neutralisierende AK gegen den "NADL"-Stamm des BVD/MD-Virus mit Titern meist $\geq 1 : 500$.

Diese wenigen Berichte zeigen, daß auch bei Ziegen die BD-Virusinfektion zu berücksichtigen ist, wenn reproduktive Einbußen auffallend werden.

2.3. Schwein:

Serologische Beziehungen zwischen ESP-Virus und BVD/MD-Virus sind seit langem bekannt. So beschrieb Darbyshire (1960, 1962) eine Kreuzreaktion im Agargel-Diffusionstest. Weitere Experimente bestätigten diese Verwandtschaft:

Beckenhauer et al. (1961) durch Infektionsversuche;
Juhász (1962), Kumagai et al. (1962) und Dinter (1963) im NT;
Mengeling et al. (1963) im Immunofluoreszenztest;
Gutekunst und Malmquist (1964) in der KBR;
Malmquist et al. (1965) im Interferenztest.

Es wurde diskutiert, ob die als Antigen wirkenden Substanzen das gesamte Virus, wahrscheinlicher jedoch ein lösliches Antigen oder Produkte aus dem Zellzerfall (ausgelöst durch das Viruswachstum) darstellten (Darbyshire 1962; Kumagai et al. 1962). Gutekunst und Malmquist (1963) wiesen nach, daß es das lösliche Antigen sein mußte, was die serologische Verwandtschaft auch zum Virus der "BD" begründete (Plant et al. 1973). Dieses lösliche Antigen erschien in Zellkulturexperimenten noch vor den reifen Viruspartikeln und wurde von diesen zum Teil gebunden (Gutekunst und Malmquist 1965).

In Schweine-Anti-ESP-Virus-Seren zeigte man mit BVD-Antigen komplementbindende AK, wobei neutralisierende AK jedoch fehlten (Gutekunst und Malmquist 1964).

Eine wichtige Beobachtung war, daß nach einer ersten Inokulation mit dem heterologen Virus und einer nachfolgenden mit dem homologen Virus die Immunantwort deutlicher ausfiel als nach einer einmaligen homologen Belastung, d. h. verabreichte man zuerst BVD-Virus und ca. drei Wochen später ESP-Virus, kam es zu einem höheren und schnelleren Titeranstieg gegen ESP-Virus als nach alleiniger ESP-Virusinokulation und umgekehrt. Diese Erscheinung bezeichnet man als "secondary response", "Booster-Effekt" oder "anamnestische Immunantwort" und sie bestätigte eine Antigenverwandtschaft (Sheffy et al.

1962; Coggins und Seo 1963).

Beckenhauer et al. (1961) und Sheffy et al. (1961) immunisierten Schweine mit bestimmten BVD-Virusstämmen gegen die ESP. Die Vorteile schienen überwältigend: BVD-Virusvakzine konnten leicht und billig hergestellt werden, ESP-Virus-AK störten bei Kontrolluntersuchungen nicht, das ESP-Virus selbst mußte nicht mehr verwendet werden und eine Übertragung des BVD-Virus unter Schweinen bzw. von Schweinen auf Rinder war bis zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet worden (Baker 1962). Andere Untersucher konnten die immunisierenden Eigenschaften des BVD-Virus gegen die ESP nicht bestätigen (Simonyi und Biró 1967) und es kam bei Belastungsversuchen zu einem protrahierten Krankheitsverlauf, wobei AK gegen beide Viren nachweisbar waren (Kumagai et al. 1962). Vergleicht man Untersuchungen über die immunisierenden Eigenschaften des BVD-Virus gegen ESP, führt dies zur Hypothese, daß der erreichte ESP-Virus-Antikörpertiter und der damit korrelierte Schutz gegen eine Erkrankung abhängt vom BVD-Virusstamm, von der inokulierten Virusmenge, der Häufigkeit von Impfungen, der Passagezahl in Zellkulturen, der Infektionsmethode und letztendlich vom einzelnen Schwein selbst (Snowdon und French 1968; Castrucci et al. 1970, 1973). Weitere Arbeiten zeigten, daß die Belastbarkeit der Immunität ebenfalls beeinflußt werde vom ESP-Virusstamm dem BVD-vakzinierete Schweine ausgesetzt wurden, wobei bei Testinfektionen zwischen 49 % (hochvirulenter Stamm "Ames") und 83 % bzw. 97 % (Feldstämme bzw. Stamm "A") der Tiere einen belastbaren Schutz gegen verschiedene ESP-Virusstämme aufbauten. Die Immunität hielt hierbei ca. zwei Jahre an (Baker et al. 1969).

Bestätigung fanden diese Ergebnisse durch Veröffentlichungen von Aynaud et al. (1974), Corthier und Aynaud (1974), Kamijo et al. (1977) und Neukirch et al. (1980), die das ESP-Virus aufgrund seiner Verwandtschaft gegenüber dem BVD-Virus bzw. aufgrund des verursachten Krankheitsbildes in zwei Subgruppen (Varianten) einteilten: hochvirulente und geringvirulente Stämme. Gegen letztere konnte man Schweine

durch eine heterologe Vakzinierung mit BVD-Virus ausreichend schützen.

Daß Schweine die BVD-Virusinfektion weiterverbreiten können, zeigten einmal Virusisolierungen aus dem Ileum, dem Rectum und der Nase von experimentell infizierten Tieren (Stewart et al. 1971; Phillip und Darbyshire 1972) und zum anderen erfolgreiche Übertragungen der Erkrankung auf Kälber nach bis zu vier Passagen in Schweinen (Fernelius et al. 1973 b). Letztere Untersucher wiesen auch auf Veränderungen biologischer Eigenschaften des Virus in vitro nach mehreren Tierpassagen hin (z. B. Zythopathogenität).

In-utero-Infektionen (spezifische AK in Föten und in Ferkeln ohne Kolostrumverfütterung; Zahl der Corpora lutea größer als Ferkelzahl; Unfruchtbarkeit; Meningitis und Choroiditis bei Ferkeln) und "Carrier-Schweine" ähnlich der Situation bei BVD-Infektionen der Rinder und Schafe wurden diskutiert (Stewart et al. 1971, 1980; Fernelius et al. 1973 a). Aufgrund dieser Gegebenheiten riet man von der Vakzinierung gegen die ESP mit BVD-Virus ab (Fernelius et al. 1973 b).

Im NT hatten BD-infizierte Lämmer größtenteils höhere Titer gegen das ESP-Virus als gegen ein BVD-Virus (Osburn et al. 1973). Ähnliche Krankheitssymptome wie bei der BD der Lämmer beschrieben, beobachtete man auch bei kongenital ESP-infizierten Ferkeln (Tremor, Hypo- und Dysmyelinogenese) (Emerson und Delez 1965; Harding et al. 1966). Ferkel von Sauen, die am 34. Trächtigkeitstag mit BD-Material infiziert wurden, wiesen bei entsprechender Beleuchtung eine hell-dunkelgestreifte Haut auf. Dabei war der Haarfollikeldurchmesser und der Grad umscheideter Follikel durchweg höher als bei den Kontrollferkeln. Bei einem Tier beobachtete man eine Meningocoele und eine Mißbildung des Kleinhirns, bei weiteren eine geringgradige Cerebellarhypoplasie (Derbyshire 1975; Terlecki 1976; Wrathall et al. 1978). Die Sauen bildeten AK gegen BD-, BVD/MD- und geringgradig auch gegen das ESP-Virus

aus.

Um ESP-Virus von BVD-Virus zu unterscheiden, prüften Tessler et al. (1977) die Stabilität beider Viren gegenüber Tween 80. Dabei trat bei den zwei verwendeten ESP-Virusstämmen nur eine Aktivitätsverminderung auf; die beiden BVD-Virusstämme wurden jedoch inaktiviert. Ob dieses Kriterium generell gültig ist, bleibt noch zu klären.

Schwierigkeiten ergeben sich auch bei der AK-Differenzierung nach BVD-Virus- bzw. ESP-Virus-Einzel- oder Doppelinfektionen, vor allem bei Titern zwischen 1 : 5 und 1 : 40 gegen ESP-Virusstamm "Alfort" (Liess 1980). Neukirch et al. (1980) und Ohnacker (1980) schlugen hierzu die Verwendung eines weniger eng mit dem ESP-Virus verwandten BVD-Virusstamm ("A 1138/69") vor, wohingegen Brüske (1980) ergänzend zum Stamm "A 1138/69" den Stamm "NADL" bzw. ausschließlich letzteren empfahl. Interpretationsschwierigkeiten woher die AK stammen, wird es vor allem bei Doppelinfektionen mit beiden Viren geben. Um hier schlüssige Aussagen geben zu können, sind auf jeden Fall mindestens zwei Untersuchungen im Abstand von mehreren Wochen notwendig.

Drei Methoden zur Unterscheidung der beiden Virus-AK stellte Jensen (1981) vor: eine abgewandelte KBR (Eskildsen und Overby 1976), einen Enzymimmuntest ("peroxidase-linked antibody"-Test = PLA-Test) (Saunders 1977) und einen Mikrotiter-NT, der nach dem Prinzip der peroxidasegebundenen AK (NPLA) abgelesen wurde. Dabei seien die modifizierte KBR und der PLA-Test in wenigen Stunden durchführbar; der NPLA-Test diene der Kontrolluntersuchung bei fraglichen Reaktionen. Die Differenzierung wurde aufgrund verschieden hoher AK-Titer vorgenommen. Im Versuch waren jedoch nur Schweine nach Einzelinfektionen. Die Diagnoseschwierigkeiten bei Doppelinfektionen sind auch hier gegeben und müssen nach der Untersuchung von zumindest einem Serumpaar (genommen im Abstand von mehreren Wochen) diskutiert werden. Die Anwendung bei Infektionen mit verschiedenen ESP-Virusvarianten bleibt zu prüfen.

In neueren Experimenten extrahierte man aus Zellkulturen, die mit ESP- bzw. BVD-Virus infiziert wurden, entsprechende Glycoproteine, welche zwar mit der Immunelektrophorese und der KBR nicht zu unterscheiden waren, jedoch nur die homologen neutralisierenden AK induzierten (Dalsgaard und Jensen 1980). Unterschiede in der Reaktion von ESP-Virus- und BVD-Virus-AK mit viralen Hüllproteinen (gp 44, gp 57) beschrieb ebenfalls Matthaeus (1981). Wie solche neuen Methoden zur AK-Differenzierung eingesetzt werden können, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

BVD-AK-Surveys unter Schweinen sind in der Literatur rar. Meist handelte es sich um selektierte Tierpopulationen bzw. experimentelle Infektionen; nur wenige waren repräsentativ für ein bestimmtes Gebiet. So ergab eine australische Arbeit aus dem Jahr 1964 mit dem Testvirusstamm "Oregon C 24 V" im NT regional unterschiedlich 6 % bzw. 80 % positive Reagenten mit Titern um 1 : 10 bzw. 1 : 100 bis 1 : 1000 (French und Snowdon 1964).

Drei von 172 untersuchten Blutproben aus der DDR reagierten positiv (Liebermann et al. 1971). Unter 1000 Schweinen aus Frankreich hatten im Mikroplaque-NT und im Plaque-Reduktionstest 4,4 % AK gegen das BVD-Virus (Plateau et al. 1978). Brüske (1980) wies bei 3,7 % bzw. 9,2 % aus 2172 Seren von bundesdeutschen Schweinen AK gegen die BVD-Stämme "A 1138/69" bzw. "NADL" als Testviren im NT nach. Eine von Jensen (1985) durchgeführte Untersuchung von 3000 Schweinen aus Dänemark auf AK gegen BVD-Virus im NT bzw. auf AK gegen ESP-Virus im NPLA-Test (Jensen 1981) ergab bei 6,4 % der Seren (Anfangsverdünnung von 1 : 2) eine positive Reaktion gegen das BVD-Virus; AK gegen das ESP-Virus wies man nicht nach.

2.4. Andere Spezies:

Sehr früh schon erkannte man, daß das BVD/MD-Virus nicht nur bei Rindern verbreitet war. 1956 beschrieben Richards et al. klinische und pathologische Symptome bei Weißwedel- (*Odocoileus virginianus*) und Großbohrhirschen (*O. hemionus*) sowie einem Gabelbock (*Antilocapra americana*) wie sie zum Teil bei der BVD/MD der Rinder gesehen werden und bezeichneten die Erkrankung als "Mucosal Disease" im weitesten Sinne. Anschließende Infektionsversuche mit bakterienfreiem Material offenbarten die Reproduzierbarkeit der Erkrankung. Es wurden Verfasser zitiert, die ähnliche Krankheitsbilder bei Hirschen beschrieben hatten: Guenther (unveröffentlicht 1954), Shope et al. (1955) sowie Fay und Boyce (1955).

In einer statistischen Auswertung von pathologischen Befunden der Tierärztlichen Hochschule in Hannover von 1937 - 1964 beschrieb Mehring (1965) ein Krankheitsbild bei drei Bantengs (*Bos - Bibos - javanicus*), einem Axis- (*Axis axis*) und einem Damhirsch (*Dama dama*), welches jenem der MD entspricht.

Von Symptomen, wie sie durch Richards et al. (1956) dargestellt wurden, bei verschiedenen Gazellenarten (Dorkas-, Henglin-, Grantgazelle - *Gazella dorcas*, *G. tilonura*, *G. granti*), einem Muntjak (*Muntiacus muntjak*), einem Gaur (*Bos - Bibos - gaurus*) und zwei Bantengs während eines Krankheitsausbruchs im Zoo Hannover berichteten Brass et al. (1966). Ob es sich bei 17 verendeten Duckern (*Cephalophus*-Arten) ebenfalls um die MD handelte, wurde in Frage gestellt. Alle bakteriologischen und virologischen Untersuchungen verliefen negativ. Weitere Beschreibungen von BVD/MD-Ausbrüchen in europäischen Zoologischen Gärten folgten:

Peters (1966, 1968) bei Davidshirsch (*Elaphorus davidianus*), Banteng und Yak (*Bos - Poëphagus - mutus*) - klinische Anzeichen (Niederlande),

Kast und Kraus (1968) bei Alpaca (*Lama pacos*) - pathologisch-anatomisch, histologisch (Bundesrepublik Deutschland),

Steger (1973) bei Rentier (*Rangifer taradus*) - klinische Anzeichen (Bundesrepublik Deutschland) und

Schröder und Ippen (1973) bei Davidshirsch, Banteng und Lama (Lama guanicoë glama) - klinische Anzeichen, pathologisch-anatomisch, histologisch (Deutsche Demokratische Republik).

Romváry (1965) gelang erstmals die BVD-Virusisolierung aus einem Reh (Capreolus capreolus). Weitere Nachweise dieses Virus führte man bei folgenden Tierarten: Büffel, Giraffe, Lama, Dam- und Rothirsch, Pferd. Hieraus ist zu ersehen, daß überwiegend Wiederkäuer für das BVD/MD-Virus empfänglich sind.

Inwieweit die BVD/MD-Virusinfektion eine Rolle bei Einhufern spielt, bleibt noch abzuklären. Bisher wurde nur die Virusisolierung aus einem sieben Tage alten Fohlen bekannt (Schipper et al. 1978). Der Virusstamm wuchs auf einer bovinen Endocardzelllinie mit Ausbildung eines für BVD/MD-Virus typischen zytopathogenen Effekts (zpE). BVD/MD-Antiserum neutralisierte das Isolat. Serologische Untersuchungen des Fohlens und seiner Stute ergaben Titer für BVD/MD-Virus von $< 1 : 16$ und für Equines Herpesvirus 1 (EHV 1) Titer von $< 1 : 4$. Bei Raubtieren, Hasen, Pavianen, einem Stachelschwein und einem Geier konnten keine BVD/MD-Virusinfektionen nachgewiesen werden (Hamblin und Hedger 1979).

Einen Überblick der bisherigen BVD/MD-Virusisolierungen gibt die Tabelle 2.4./1.

Tab. 2.4./1 BVD/MD-Virusisolierungen:

Land	Spezies	Methode	Verfasser
Ungarn	Reh	Agargeltest (indirekt)	Romváry (1965)
Zentralafrikan. Republik	Büffel (Syncerus caffer)		Provost (1968)
BRD	Lama		Kast und Kraus (1968)
Kenia	Giraffe (Giraffa camelopardalis)		Plowright (1969)

Land	Spezies	Methode	Verfasser
BRD	Reh		Schellner (1977)
USA	Pferd (<i>Equus przewalskii caballus</i>)	Anzüchtung mit zpE und Neutralisat. durch BVD-Antiserum	Schipper et al. (1978)
BRD	Damhirsch	Anzüchtg. und Immunofluores.	Neumann et al. (1980)
Großbritannien	Rothirsch (<i>Cervus elaphus</i>)	Immunofluores. nach Anzüchtg.	Nettleton et al. (1980)
BRD	Damhirsch	END (Exaltation of Newcastle Disease)	Weber et al. (1982)

Klinisch inapparente Infektionen vergleichbar mit solchen bei Rindern, Schafen und Schweinen wurden zumindest bei Hirschartigen (Damhirsch in Gattern ohne Rinderkontakt) diskutiert (Weber et al. 1982).

Nachdem erste Untersuchungen auf BVD/MD-Antikörper bei Rehen ohne Erfolg blieben (Bögel 1964), folgten viele Berichte bei nachstehenden Tierfamilien: Hirsche (Cervidae), Giraffen (Giraffidae), Hornträger (Bovidae), Gabelhorntiere (Antilocapridae), Altweltliche Schweine (Suidae), Pferde (Equidae) und Känguruhs (Macropodidae).

Eine Zusammenfassung wird durch Tabelle 2.4./2 gezeigt.

Tab. 2.4./2 BVD/MD-Antikörpernachweise im NT:

Land	Spezies	Verfasser
USA	Weißwedelhirsch	Kahrs et al. (1964)
Tasmanien	Bennettkänguruh (<i>Wallabia rufogrisea</i>)	Munday (1966)
Zentralafrika	Büffel Kuhantilope (<i>Alcelaphus buselaphus</i>) Riedbock (<i>Redunca redunca</i>) Rotstirngazelle (<i>Gazella rufifrons</i>)	Provost et al. (1967)

Land	Spezies	Verfasser
USA	Weißwedelhirsch	Friend und Halterman (1967)
Ostafrika	Büffel Elenantilope (<i>Taurotragus oryx</i>)	Plowright (1969)
Kanada	Elch (<i>Alces alces</i>)	Thorson und Herderson (1971)
Tasmanien	Damhirsch	Munday (1972)
Ostafrika	Giraffe Wasserbock (<i>Kobus ellipsiprymnus</i>)	Fay (1972)
Nordamerika	Dickhornschaf (<i>Ovis canadensis</i>)	Parks und England (1974)
England	Damhirsch	McDiarmid (1975)
Kanada	Gabelbock (<i>Antilocapra americana</i>)	Barrett und Chalmers (1975)
BRD	Reh Rothirsch	Weber et al. (1978)
Großbritannien	Rothirsch Damhirsch Sikahirsch (<i>Cervus nippei</i>) Wasserreh (<i>hydropotes inermis</i>)	Lawman et al. (1978)
USA	Pferd	Schipper et al. (1978)
Afrika (versch. Länder)	Bovidae: Büffel Nyala (<i>Tragelaphus angasi</i>) Großer Kudu (<i>Tragelaphus strepsiceros</i>) Elenantilope Wasserbock Litschi-Wasserreh (<i>Hydrotragus leche</i>) Großer Riedbock (<i>Redunca arundinum</i>) Rappenantilope (<i>Hippotragus niger</i>) Spießbock (<i>Oryx gazella</i>) Leierantilope (<i>Damaliscus lunatus</i>) Kuhantilope Streifengnu (<i>Connochaetes taurinus</i>)	Hamblin und Hedger (1979)

Land	Spezies	Verfasser
	Schwarzfersenantilope (Alpyceros melampus) Springbock (Antidorcas marsupialis) Kronenducker (Sylvicapra grimmia) Giraffidae: Giraffe Suidae: Warzenschwein (Phacochoe- rus aethiopicus)	
Großbri- tannien	Rothirsch	Nettleton et al. (1980)
USA	Gabelbock	Stauber et al. (1980)

Die bisherigen Berichte zeigen, daß die BVD/MD-Virusinfektion auch unter Wildtieren seit langer Zeit weit verbreitet ist. Welche Bedeutung diesen Tierfamilien im epidemiologischen Geschehen der Erkrankung bei Rindern und Schafen zukommt, bleibt abzuwarten.

3. Eigene Untersuchungen:

3.1. Material und Methoden:

3.1.1. Blut- bzw. Serumproben:

Die zum größten Teil als Vollblut, zum geringeren Teil als Serum eingeschickten Proben stammten bis auf einige Ziegen- und Schafseren aus dem nordbayerischen Raum. Sie wurden im Rahmen verschiedener Untersuchungen (Schaf vor allem Maedi-Visna, Brucellose; Ziege vor allem Caprine Arthritis Encephalitis = CAE; Schwein vor allem Aujeszky'sche Krankheit, ESP, Transmissible Gastroenteritis = TGE; Pferd vor allem EHV₁) im Zeitraum zwischen Januar und August 1985 an das Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen in Nordbayern, Abteilung II in Nürnberg gesandt. Einige Schweineserumproben erhielt ich freundlicherweise vom Tiergesundheitsdienst in Nürnberg, wo diese im Rahmen der Creatinin-Kinase-Bestimmung gesammelt wurden. Insgesamt konnten untersucht werden: 865 Schweineseren aus 159 Betrieben, 627 Ziegen-, 497 Schaf- und 6 Pferdeseren; zudem standen Seren von zwei Steinböcken (*Capra ibex*), einer Nilgau- (*Boselaphus tragocamelus*) und einer Mendesantilope (*Addax nasomaculatus*) zur Verfügung. Die Anzahl der Herden bei Ziegen und Schafen konnte nicht exakt ermittelt werden, da zum Teil Proben verschiedener Betriebe ohne genaue Aufteilung in einer Sendung geschickt wurden.

Den Untersuchungsanträgen war in den überwiegenden Fällen der Vorbericht zu entnehmen. Aussagen über Bestandsgröße und andere Tierarten am Hof konnten jedoch nicht entnommen werden.

Da es sich in den meisten Fällen um Kontroll- bzw. Exportuntersuchungen handelte, könnte man von einer zufälligen Auswahl ausgehen.

Nach Zentrifugation der Blutproben bei 3000 Umdrehungen pro Minute (U/Min.) für fünf Minuten und Trennung der Seren vom

Blutkuchen wurden alle Seren in sterile Plastikröhrchen (Greiner, Nürtingen) gefüllt und im Wasserbad für 30 Minuten bei 56°C inaktiviert. Anschließend wurden die Proben bis zur Durchführung des NTs bei -20°C eingefroren.

3.1.2. Zellkultur:

Für die Virusvermehrung und den NT wurden bovine embryonale Lungenzellen (BEL) der ersten und zweiten Subkultur verwendet.

3.1.2.1. Herstellung primärer BEL-Zellkulturen:

Aus drei bis vier Monate alten Rinderföten erhalten vom Städtischen Schlachthof Nürnberg wurde die Lunge steril entnommen. Nach Entfernung der groben bindegewebigen Anteile, der Bronchen und Blutgefäße wurde das Organ in haselnußgroße Stücke zerschnitten und diese in einen Erlmeyerkolben (0,5 oder 1,0 Liter) überführt.

Anschließend kam eine antibiotikaversetzte und phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (AB-PBS-Lösung) hinzu, so daß die Lungenteile vollkommen bedeckt waren. Diese Mischung blieb über Nacht im Kühlschrank bei 4°C stehen.

Am nächsten Morgen wurde die Lösung abgekippt, wurden die Lungenstückchen nochmals mit AB-PBS-Lösung gewaschen und die Organteile in eine große Glaspetrischale verbracht, wo die restlichen Bronchen, Blutgefäße und Pleura soweit möglich entfernt und die Lungenstückchen mit Pinzette und Schere mechanisch zerkleinert wurden. Diesen Organbrei überführte man nun in einen Erlmeyerkolben (0,5 oder 1,0 Liter), gab erneut AB-PBS-Lösung hinzu, schüttelte ihn kurz auf und goß die überstehende Flüssigkeit ab. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal mit 28°C warmer PBS-Lösung wiederholt.

Anschließend wurde mit PBS-Trypsin-Lösung (0,25 %-ig, 28°C) für 15 Minuten auf einem Magnetrührer bei Raumtemperatur vor-trypsiniert und der Überstand verworfen.

Nun begannen die eigentlichen Trypsinierungszyklen. Nach jeweils einer halben Stunde wurden die durch das Trypsin herausgelösten Zellen und Gewebestücke in einen anderen Erlmeyerkolben überführt, wo die gesammelte Zellen-Gewebe-Suspension weiter auf einem Magnetrührer durch die Trypsinlösung aufgeschlossen wurde. Diesen Vorgang wiederholte man fünf- oder sechsmal bis die Lungenstückchen größtenteils verdaut waren.

Es folgte eine zweimalige Filtration - erst durch eine zweilagige, danach durch eine dreilagige sterile Gaze, so daß die Suspension nun nahezu vollkommen aus Einzelzellen bestand. Das Filtrat wurde jeweils in einem Becherglas aufgefangen. Anschließend zentrifugierte man die Zellsuspension für zehn Minuten bei 1500 U/Min., kippte den Überstand ab und resuspendierte das Sediment mit PBS-Lösung. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt um das restliche Trypsin zu entfernen. Am Ende wurde das Sediment mit 20 ml Anzuchtmedium (AZM) aufgenommen und die Zelldichte der auf diese Weise erhaltenen Suspension bestimmt.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Kautelen durchgeführt.

3.1.2.2. Zellzählung und Anzüchtung:

Um die Zellen zur Zählung sichtbar zu machen, stellte man eine Farblösung aus 3,9 ml PBS-Lösung und 1,0 ml 0,1 %-iger Kristallviolett-Lösung her in die 0,1 ml der oben beschriebenen Zellsuspension verbracht wurden. Die 1 : 50 verdünnte angefärbte Zellsuspension wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bei 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt.

Auf diese Weise erhielt man die Zellzahl/ml der Ausgangszellsuspension. Diese wurde nun so mit AZM und 10 % Neugeborenen-Kälberserum (NKS; Gibco, Karlsruhe) verdünnt, daß ca. 500 000 Zellen/ml enthalten waren. Davon gab man jeweils 80 ml in Rouxschalen.

Eine schnelle und einfache Methode in der virologischen Ab-

teilung des Landesuntersuchungsamtes zur Bestimmung der Anzahl an benötigten Rouxschalen und damit der Menge an AZM war: Man zählte auf jeder Seite der Kammer vier Felder aus, bildete den Mittelwert, der so die Anzahl der Rouxschalen ergab, welche mit jeweils 80 ml der mit AZM + 10 % NKS verdünnten Zellsuspension beschickt wurden.

Die mit Zellen gefüllten Rouxschalen kamen für zwei oder drei Tage in einen 37°C-Brutschrank, so daß die lebensfähigen Zellen festhafteten und erste Plasmaausläufer bildeten, ehe ein Mediumwechsel mit Erhaltungsmedium (EHM) und 5 % fötalem Kälberserum (FKS; Biochrom, Berlin) durchgeführt wurde. Nach dem Dichtwachsen bei 37°C dienten diese Primärkulturen als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Subkulturen.

Um eine eventuelle Kontamination der Zellen mit BVD/MD-Virus auszuschließen, wurden von jedem Fötus ein Zellansatz auf einen Lab-tek^R-Zellkultur-Objektträger (Miles Scientific; beziehbar über Bayer Diagnostik, München) gegeben und nach dem Dichtwachsen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Hierzu wurden 0,3 ml verdünnte Zellsuspension in jede der acht Kammern gegeben. Nach dem Dichtwachsen entfernte man die Trennwände und bedeckte nach Trocknung und 20-minütiger Fixierung in Aceton von -20°C den Objektträger mit BVD/MD-Konjugat (VDV - Gamakon, Bioveta-Nitra, CSSR; beziehbar über Firma H. Neumann, Oldenburg), welches mit 1 %-igem Evansblau und PBS-Lösung 1 : 15 verdünnt wurde. Der präparierte Objektträger wurde für eine Stunde in eine feuchte Kammer bei 37°C gelegt, anschließend dreimal mit PBS-Lösung und einmal mit Aqua bidest. gewaschen, getrocknet, mit einem Puffer-Glycerin-Gemisch (7 : 3) überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Bei 100- bzw. 250-facher Vergrößerung wurde die Zellkultur mit einem Fluoreszenzmikroskop (Dialux 20, Leitz, Wetzlar; Leitz Filter-Block 12, Anregungsfilter: BP 450-490, Sperrfilter: LP 515) auf fluoreszierende Plaques untersucht.

Eine zusätzliche Kontrolle auf Virusfreiheit stellte die bei den NTs mitgeführte Viruskontrolle in Form eines "Interferenztests" dar.

3.1.2.3. Vermehrung von BEL-Zellen:

Nach Abkippen des Mediums einer dichtgewachsenen Primärkultur und kurzem Spülen des Zellrasens mit einer physiologischen Salzlösung, die 0,02 % Trypsin und 0,05 % Versen (EDTA) enthielt (STV-Lösung), wurde die Zellkultur in der Rouxschale mit ca. 1 - 2 ml STV-Lösung überschichtet und bis zum Ablösen der Zellen in einen Brutschrank mit 37°C gelegt. Nachfolgend wurden die abgelösten Zellen nach Zusatz von ca. 5 ml EHM + 5 % FKS durch mehrmaliges Ansaugen und Ausstoßen über eine Pipette mit einem Gummibällchen (Pipettierhilfe) am Ende suspendiert.

Die gut durchmischten Zellen wurden - verglichen mit dem Ausgangsvolumen - in einem Teilungsverhältnis von 1 : 1,5 in EHM + 5 % FKS überführt, auf neue Rouxschalen bzw. kleinere Vierkantflaschen (20 ml Zellsuspension) verteilt und in einen 37°C-Brutschrank gelegt. Die so erhaltene Sekundärkultur wuchs in ca. drei bis vier Tagen zu einem dichten Zellrasen heran.

Der geschilderte Vorgang läßt sich mehrmals wiederholen. In dieser Arbeit wurden zur Virusvermehrung bzw. zum NT jedoch nur die als empfindlicher angesehenen Sekundär- bzw. Tertiärkulturen verwendet.

3.1.2.4. Einfrieren und Lagern von BEL-Zellen:

Um alle Seren einer Spezies mit den Zellen der Lunge eines Fötusses auszutesten (zum Ausschluß eventuell vorhandener individueller Unterschiede) war es nötig einen Zellvorrat anzulegen. Hierzu mußten Primärkulturen eingefroren und bei Gebrauch Sekundärzellen angezüchtet werden.

Dies wurde wie folgt durchgeführt: Nach Ablösen der primären BEL-Zellen mit STV-Lösung (s. o.), Zentrifugation der Zellsuspension für drei Minuten bei 1000 U/Min. in einem Zentrifugenglas und Abkippen des Überstandes resuspendierte man die Zellen mit 5 ml Gefrierlösung. Diese bestand aus

1,50 ml FKS (30 %)

0,35 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (7 %)

ad 5,00 ml EHM mit 5 % Laktalbumin (LA) (63 %).

Das Zentrifugenglas wurde nach Abflammen durch einen Gummistopfen verschlossen, dieser mit Aluminiumfolie umhüllt und in Zellstoff eingewickelt. Die auf diese Weise behandelten Primärkulturen eines Fötusses verbrachte man in einen Styroporkarton und stellte sie über Nacht in eine Gefriertruhe mit -75°C . Damit war gewährleistet, daß die Zellsuspension langsam herunterkühlte und nur wenige Zellen Schaden nahmen. Am nächsten Tag kamen die Röhrchen mit den tiefgefrorenen Zellen auf einen Ständer und konnten bei -75°C vier bis sieben Monate bis zum Gebrauch aufbewahrt werden.

Zum Gebrauch wurden die eingefrorenen Zellen schnell im ca. 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, bei 1000 U/Min. für drei Minuten zentrifugiert und der Bodensatz mit EHM resuspendiert. Ein nochmaliger Waschvorgang sollte das DMSO so weit wie möglich entfernen.

Nach dem Auftauen wurden Sekundärkulturen angelegt, indem man ein Röhrchen gewaschener, resuspendierter Zellen in 60 ml EHM mit 10 % FKS aufnahm und in Vierkantflaschen (20 ml je Flasche) aussäte. Zum NT löste man nach dem Dichtwachsen die Zellen von der Oberfläche mit STV-Lösung ab und verwendete sie als Tertiärzellen.

3.1.3. Virusstämme und deren Vermehrung:

Zur Durchführung des NTs standen zwei BVD/MD-Virusstämme zur Verfügung, die freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät an der Universität in München bereitgestellt wurden:

Oregon C 24 V (am 27. 11. 1981 lyophilisiert) (Gillespie et al. 1960)

NADL (am 25. 11. 1976 lyophilisiert) (Gutekunst und Malmquist 1963).

Über mehrere Passagen wurden die beiden Stämme an das hiesige Zellsystem adaptiert. Sie wuchsen mit einem deutlichen zpE, der sich wie folgt darstellte: Auflockerung des Zellverbandes; Entstehung von kleinen Vakuolen im Zytoplasma, die sich vergrößerten und zum Teil zusammenflossen; Zellzerstörung und Ablösung der Kultur von der Glasoberfläche. Der zpE war beim Stamm "NADL" drei bis vier Tage nach der Inokulation deutlich ausgeprägt und erschien meist einen halben Tag früher als beim Stamm "Oregon C 24 V".

Nach anfänglichen Schwierigkeiten mit der Virusvermehrung erreichten die beiden BVD/MD-Virusstämme folgende Titer:
Oregon C 24 V nach 15 BEL-Zellpassagen: $5,12 \times 10^3$ KID₅₀/ml,
das entspricht 256 KID₅₀ je 0,05 ml;
NADL nach 9 BEL-Zellpassagen: $1,024 \times 10^4$ KID₅₀/ml,
das entspricht 512 KID₅₀ je 0,05 ml.

Eine ausreichende Menge wurde in sterile 2 ml Glasfläschchen mit Drehverschluß (Serolab, Aidenbach) eingefüllt und bei -75°C gelagert.

3.1.4. Mikroneutralisationstest:

Der NT wurde in zwei Stufen durchgeführt: Im ersten Schritt setzte man das Serum in einer Verdünnung von 1 : 2 an. Die dabei positiven Seren wurden in einem zweiten Schritt austitriert.

Die Mikrotiterplatten (Nunclo^Rn, Nunc, Wiesbaden) wurden quer in zwei Hälften eingeteilt (s. Abb. 3.1./1), so daß jeweils vier Vertiefungen (wells) pro Probe senkrecht untereinander zur Verfügung standen. In jede Vertiefung wurden 0,025 ml Probandenserum mit einer Tropfpipette (Titertek^R, Flow Lab GmbH, Bonn) gegeben. Anschließend stellte man die 1 : 2 Verdünnung her, indem man 0,025 ml EHM mit 5 % FKS dazupipettierte.

Im Suchtest wurde der BVD-Stamm "Oregon C 24 V" der 15. BEL-

Zellpassage (s. o.) in einer Verdünnung von 1 : 2 ($\hat{=}$ 100 KID₅₀/0,05 ml) verwendet. 0,05 ml dieser Virusverdünnung wurden nun jeweils über die oberen beiden Vertiefungen (Reihen A und B bzw. E und F) verteilt. Die unteren beiden Wells (Reihen C und D bzw. G und H) dienten der Serumkontrolle und wurden dementsprechend mit 0,05 ml EHM + 5 % FKS gefüllt.

Abb. 3.1./1 Einteilung einer Mikrotiterplatte:

	ZK	VK	IS	Probandenserum								
	1:2 :20 :200											
A	○	○	○	○								NT
B	○	○										
C	○											SK
D	○											
E												
F												
G												
H												

ZK = Zellkontrolle
 VK = Viruskontrolle
 IS = Immunserum
 NT = Neutralisationstest
 SK = Serumkontrolle

Mehrere solcher Platten stellte man übereinander, deckte die oberste mit einem Plastikdeckel ab und ließ das Virus-Serum-Gemisch bei 37°C in einem Brutschrank mit feuchter 5 % CO₂ enthaltender Atmosphäre eine Stunde lang inkubieren. Anschließend kamen jeweils 0,05 ml einer inzwischen hergestellten Suspension aus sekundären BEL-Zellen, die auf 200 000

bis 300 000 Zellen/ml eingestellt war, hinzu.

Die Platten wurden in den oben beschriebenen Brutschrank zurückgelegt und am nächsten Tag nach dem Anwachsen der Zellen mit einer nichttoxischen Klebefolie verschlossen. Danach wurde der Ansatz für weitere vier Tage bis zur Endablesung am sechsten Tag in einen "trockenen, unbegasten" 37°C-Brutschrank gebracht. Täglich wurden die Zellkulturen auf einen möglichen zpE bzw. auf dessen Hemmung hin kontrolliert. Auf jeder Platte wurden Serum- und Zellkontrollen mitgeführt. Zu jedem Testansatz gehörten weiterhin eine Viruskontrolltitration und eine Spalte mit BVD-Immunserum (vom Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayerns in Ober-schleißheim) zur Überprüfung der Spezifität der Virusneutralisation. Wie die Viruskontrolltitrationen zeigten, enthielten die Testvirus-Gebrauchsverdünnungen zwischen 50 und 250 KID₅₀/0,05 ml.

Abgelesen wurde mit einem Umkehrmikroskop der Firma Olympus, Tokyo bei hundertfacher Vergrößerung. Als positive Reaktion wurde gewertet, wenn zumindest in einer Vertiefung der zytopathogene Effekt des Virus gehemmt war. Diese positiven Seren wurden bei -20°C gesammelt und in einem neuen Ansatz ab einer Anfangsverdünnung von 1 : 4 (mit "Oregon C 24 V") bzw. von 1 : 2 (mit "NADL") in Zwischenschritten mit einer 12-Kanal-Eppendorfpipette (Titertek^R, Flow Lab GmbH, Bonn) austitriert.

Vergleichend wurde jede positive Probe mit den Stämmen "Oregon C 24 V" (Gebrauchsverdünnung 1 : 2) und "NADL" (Gebrauchsverdünnung 1 : 5) neutralisiert. Um Material zu sparen, wurden die Platten wiederum geteilt und jeweils zwei Titrationsreihen pro Serum bis zur Verdünnung von 1 : 32 angelegt. Seren, die bei dieser Verdünnung immer noch Hemmung des Viruswachstums zeigten, wurden in einem neuen Ansatz weiterverdünnt.

Abgesehen von den Serumkontrollen wurden die oben beschriebenen Kontrollen erneut mitgeführt.

3.1.5. Titerberechnung:

Die positiven Seren aus dem Suchtest mit dem BVD-Virusstamm "Oregon C 24 V" wurden mit diesem und dem BVD-Virusstamm "NADL", wie oben beschrieben, austitriert.

Diejenige Serumverdünnung, bei welcher der Zellrasen in 50 % der Vertiefungen auf den Mikrotiterplatten keinen zpE zeigte, wurde als Neutralisationstiter bezeichnet. Zur Neutralisationstiterberechnung wurde die Methode nach Kärber (1931) herangezogen.

3.1.6. Neutralisations- und Immunofluoreszenztest (NIF-Test) für Schweineseren auf ESP:

Um bei den positiven Schweineseren eine Kreuzreaktion mit dem ESP-Virus auszuschließen, wurde der NIF-Test auf Lab-tek^R-Zellkultur-Objektträgern durchgeführt.

Hierzu wurden 0,05 ml Probandenserum (1 : 10 mit EHM + 5 % FKS verdünnt) und 0,05 ml ESP-Virusstamm "Alfort" (auf 100 KID₅₀/0,05 ml eingestellt) für eine Stunde in einem feuchten 37°C-Brutschrank bei 5 % CO₂ enthaltender Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden 0,3 ml einer PK₁₅-LA-Zellsuspension (200 000 bis 300 000 Zellen/ml) zugegeben.

Nach drei Tagen im oben beschriebenen Brutschrank nahm man die Objektträger mit den behandelten Zellkulturen heraus um das Medium und den Aufsatz zu entfernen. Nun wurden die Zellkulturen luftgetrocknet, in -20°C kaltem Aceton für 20 Minuten fixiert, erneut luftgetrocknet und mit 1 : 20 verdünntem und mit Fluoreszin konjugiertem ESP-Serum (VMO - Gamakon, Bioveta-Nitra, CSSR; beziehbar über Firma H. Neumann, Oldenburg) überschichtet. Das Konjugat wurde in einer Lösung bestehend aus 1 %-igem Evansblau (10 %), PBS (85 %) und ESP-Konjugat (5 %) angewandt. Für 30 Minuten kamen die so beschichteten Zellkulturen in eine feuchte Kammer bei 37°C. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS und einmal mit Aqua bidest. gewaschen, getrocknet und mit einer

Puffer-Glycerin-Mischung (7 : 3) überschichtet und mit Deckgläschen versehen.

Abgelesen wurde mit einem Leitz Fluoreszenzmikroskop (s. o.) bei 100- bzw. 250-facher Vergrößerung.

Die im NIF-Test positiven Seren wurden mit der gleichen Methode in Fünferschritten bis zum Endpunkt austitriert.

Bei allen Ansätzen wurden Zell-, Virus- und Serumkontrollen, sowie eine Kontrolle mit ESP-Immunserum mitgeführt.

3.2. Ergebnisse:

3.2.1. Positive Reagenten im NT und Titerhöhen:

In Tabelle 3.2./1 ist eine Übersicht der Ergebnisse aus dem Suchtest bei einer Serumverdünnung von 1 : 2 mit dem BVD-Virusstamm "Oregon C 24 V" als Testvirus wiedergegeben. Dabei traten beim Schaf 20,1 %, beim Schwein 3,9 % und bei der Ziege 3,0 % positive Reagenten auf. Die Untersuchungen bei sechs Pferdeseren, sowie den Seren von zwei Steinböcken, einer Nilgau- und einer Mendesantilope verliefen mit negativem Resultat.

Tab. 3.2./1 positive Reagenten im NT:

Tierart	Anzahl der untersuchten Seren	Anzahl pos. Reagenten bei Serumverdünnung. 1 : 2	% pos. Reagenten
Schwein	865	34	3,9
Ziege	627	19	3,0
Schaf	497	100	20,1
Pferd	6	0	0
Steinbock	2	0	0
Nilgauant.	1	0	0
Mendesant.	1	0	0

Für die anschließende Titration der positiven Reagenten wurden die BVD-Virusstämme "Oregon C 24 V" und "NADL" verwendet.

Die Serumverdünnung begann beim Stamm "Oregon C 24 V" bei 1 : 4 (Verdünnung von 1 : 2 bereits im Suchtest durchgeführt) und beim Stamm "NADL" bei 1 : 2. Dabei wurde in Zweierschritten bis zur Verdünnung von 1 : 32 austitriert. Die beiden Seren, die bei der Verdünnungsstufe von 1 : 32 noch immer vollständige Hemmung des Viruswachstums zeigten, wurden bis zum jeweiligen Endpunkt weiterverdünnt.

Die Neutralisationstiterberechnung erfolgte nach der Methode von Kärber (1931).

Die Ergebnisse mit dem Virusstamm "Oregon C 24 V" sind in Tabelle 3.2./2 und die mit dem Stamm "NADL" in Tabelle 3.2./3 zusammengefaßt. Dabei zeigte sich, daß mit dem ersten Stamm die Mehrzahl der Titer unter 1 : 8 und mit dem zweiten meist unter 1 : 4 lag.

Tab. 3.2./2 Titerhöhen der positiven Reagenten mit "Oregon C 24 V":

Titer Tierart	1:3	1:4	1:6	1:8	1:12	1:16	1:24	1:32	1:48	1:64
Schwein	24	-	1	1	3	1	2	1	-	1
Ziege	2	2	8	1	2	2	1	1	-	-
Schaf	78	6	4	7	1	2	-	1	1	-

Tab. 3.2./3 Titerhöhen der positiven Reagenten mit "NADL":

Titer Tierart	neg.	1:2	1:3	1:4	1:6	1:8	1:12	1:16	1:32	1:64
Schwein	8	1	20	1	1	2	-	1	-	-
Ziege	-	-	14	1	1	1	2	-	-	-
Schaf	17	2	78	2	1	-	-	-	-	-

Errechnet man die arithmetischen Durchschnittstiter der mit dem Virusstamm "Oregon C 24 V" bei einer Serumverdünnung von 1 : 2 positiven Proben nach Tierart und Virusstamm getrennt,

so wird deutlich, daß jene für den Stamm "NADL" erheblich niedriger liegen als die für den Stamm "Oregon C 24 V". Es ist zu bemerken, daß die acht Schweine- und 17 Schafseren, die den Stamm "NADL" nicht neutralisierten, bei der entsprechenden Durchschnittstiterberechnung herausgenommen wurden.

In Tabelle 3.2./4 sind die jeweiligen Durchschnittstiter aufgeführt.

Tab. 3.2./4 Durchschnittstiter mit den BVD/MD-Virusstämmen "Oregon C 24 V" und "NADL":

Tierart	Durchschnittstiter mit	
	"Oregon C 24 V"	"NADL"
Schwein	1 : 8,3	1 : 3,7
Ziege	1 : 9,6	1 : 4,4
Schaf	1 : 4,6	1 : 3,0

Um genauere Daten zu erhalten, wurden die Titer der einzelnen Seren unter Berücksichtigung der beiden Virusstämme verglichen. Dabei bestätigte sich weitgehend das Ergebnis der Durchschnittswerte: Nur in drei Fällen aus insgesamt 1989 untersuchten Schweine-, Ziegen- und Schafseren lagen die Titer für den Stamm "NADL" höher als für den Stamm "Oregon C 24 V". Die Vergleiche zwischen den einzelnen positiven Seren sind in Tabelle 3.2./5 aufgelistet, wobei die drei oben genannten Fälle markiert (|||) sind.

Tab. 3.2./5 Vergleich der Titerhöhen der entsprechenden positiven Seren nach den beiden Virusstämmen getrennt:

Tierart	Virusstamm	Titerpaare mit jeweiliger Anzahl der Probanden in Klammern			
Schwein	Oregon	1:3 (8x)	1:3 (1x)	1:3 (15x)	1:6 (1x)
	NADL	neg.	1:2	1:3	1:3
	Oregon	1:8 (1x)	1:12 (2x)	1:12 (1x)	1:16 (1x)
	NADL	1:3	1:3	1:8	1:4

Tierart	Virus-stamm	Titerpaare mit jeweiliger Anzahl der Probanden in Klammern			
Schwein	Oregon	1:24 (1x)	1:24 (1x)	1:32 (1x)	1:48 (1x)
	NADL	1:6	1:8	1:3	1:16
Ziege	Oregon	1:3 (2x)	1:4 (2x)	1:6 (6x)	1:6 (1x)
	NADL	1:3	1:3	1:3	1:6
	Oregon	1:6 (1x)	1:8 (1x)	1:12 (2x)	1:16 (1x)
	NADL	1:8	1:12	1:3	1:3
	Oregon	1:16 (1x)	1:24 (1x)	1:32 (1x)	
	NADL	1:12	1:4	1:3	
Schaf	Oregon	1:3 (17x)	1:3 (1x)	1:3 (59x)	1:3 (1x)
	NADL	neg.	1:2	1:3	1:6
	Oregon	1:4 (1x)	1:4 (5x)	1:6 (4x)	1:8 (6x)
	NADL	1:2	1:3	1:3	1:3
	Oregon	1:8 (1x)	1:12 (1x)	1:16 (1x)	1:16 (1x)
	NADL	1:4	1:3	1:3	1:4
	Oregon	1:32 (1x)	1:64 (1x)		
	NADL	1:3	1:3		

Bei der Überprüfung der Seren auf ESP-spezifische AK war der NIF-Test nur bei einer Serumprobe positiv mit einem Titer von 1 : 10; die entsprechenden Titer für den NT mit den BVD-Virusstämmen "Oregon C 24 V" und "NADL" lagen bei 1 : 24 bzw. bei 1 : 6.

3.2.2. Räumliche Verteilung der positiven Reagenten:

Die räumliche Verteilung der positiven Reagenten bei Schweinen und Schafen wird in den Tabellen 3.2./6 und /7 aufgezeigt. Die Antikörperträger werden nach Landkreisen getrennt dargestellt. Für die Ziegen war diese Unterteilung nicht möglich, da nur Proben aus den Regierungsbezirken ohne weitere Aufschlüsselung nach Kreisen eingesandt wurden. Sie werden in den Tabellen 3.2./8 bis /10 mit den Schweinen und Schafen

zusammen nach Regierungsbezirken aufgegliedert dargestellt.

Tab. 3.2./6 Verteilung positiv reagierender Schweineseren über die Landkreise:

Landkreis	Anzahl pos. Reagenten	Gesamtzahl	% pos. Reagenten
Ansbach	4	181	2,2
Bayreuth	2	20	10,0
Coburg	3	127	2,4
Hof	1	15	6,7
Neustadt/Aisch (NEA)	10	140	7,1
Besamungsverein NEA	6	125	4,8
Rhön-Grabfeld	1	3	33,3
Roth	5	42	11,9
Weißenburg-Gunzenhsn.	2	48	4,2

Tab. 3.2./7 Verteilung positiv reagierender Schafseren über die Landkreise:

Landkreis	Anzahl pos. Reagenten	Gesamtzahl	% pos. Reagenten
Ansbach	3	20	15,0
Aschaffenburg	3	25	12,0
Kitzingen	14	57	24,6
Main-Spessart	1	13	7,7
Neustadt/Aisch	2	40	5,0
Nürnberger Land	1	63	1,6
Rhön-Grabfeld	8	59	13,6
Schweinfurt	34	88	38,6
Weißenburg	29	44	65,9
Würzburg	3	19	15,8
Freising	2	3	66,7

Tab. 3.2./8 Verteilung positiv reagierender Schweineseren
über die Regierungsbezirke:

Regierungsbezirk	Anzahl pos. Reagenten	Gesamtzahl	% pos. Reagenten
Mittelfranken	27	565	4,8
Oberfranken	6	224	2,7
Oberpfalz	0	29	0
Unterfranken	1	47	2,1
gesamt	34	865	3,9

Tab. 3.2./9 Verteilung positiv reagierender Schafseren
über die Regierungsbezirke:

Regierungsbezirk	Anzahl pos. Reagenten	Gesamtzahl	% pos. Reagenten
Mittelfranken	35	183	19,1
Oberfranken	0	3	0
Oberpfalz	0	1	0
Unterfranken	63	261	24,1
Oberbayern	2	49	4,1
gesamt	100	497	20,1

Tab. 3.2./10 Verteilung positiv reagierender Ziegenserren
über die Regierungsbezirke bzw. ein umschrie-
benes Gebiet:

Regierungsbezirk bzw. Gebiet	Anzahl pos. Reagenten	Gesamtzahl	% pos. Reagenten
Mittelfranken	6	175	3,4
Oberfranken	0	47	0
Oberpfalz	5	147	3,4
Unterfranken	6	182	3,3
Tiergarten Nbg.	2	7	28,6
Südbayern	0	69	0
gesamt	19	627	3,0

Zum besseren Verständnis sind diese Ergebnisse in den Abbildungen 3.2./1 bis /3 eingetragen. Die beiden positiv reagierenden Schafseren aus Oberbayern wurden hierbei nicht erfaßt. Auffällig ist, daß bei den Schweinen und Schafen gewisse Regierungsbezirke durch gehäuftes Auftreten von AK-Trägern hervortreten. So sind dies Mittelfranken bei den Schweinen und neben Unter- ebenfalls Mittelfranken bei den Schafen. BVD/MD-AK-tragende Ziegen sind relativ einheitlich über Nordbayern verteilt.

Zu beachten ist, daß in den östlichen und nordöstlichen Randgebieten des Untersuchungsraumes (Oberfranken und Oberpfalz) keine oder nur wenige positive Reagenten gefunden wurden.

3.2.3. Beziehung zu Verwerfensfällen:

Wie bereits erwähnt war den Vorberichten der Grund der Einsendung zu entnehmen. So wurden 45 Schweineseren aus sieben Betrieben und zwei Schafseren aus einer Herde zur Abklärung der Abortursache eingesandt. Keines dieser Seren reagierte jedoch im Suchtest mit dem BVD/MD-Virusstamm "Oregon C 24 V" positiv.

Abb. 3.2./2: räumliche Verteilung AK-tragender Schafe:





4. Diskussion:

4.1. Allgemeines:

Der Mikroneutralisationstest als Mittel zur Darstellung der Antikörperverteilung innerhalb einer Population ist in der Literatur vielfach beschrieben (s. Tabellen 2.1./1, 2.2./1 und 2.4./2) und stellt eine schnelle, materialsparende und sichere Methode vor allem bei großen Untersuchungsreihen dar.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse stellt sich die Frage, inwiefern die Serumverdünnung von 1 : 2 als Grenztiter signifikant für eine durchlaufene Infektion ist. Meist werden erst Serumverdünnungen von 1 : 4 und höher als positiv gewertet (St. George 1971; Løken et al. 1982 a; Becker 1983). Doch findet man auch Arbeiten, in denen die Seren unverdünnt oder in der Verdünnung von 1 : 2 untersucht und bei Virus-hemmung als positiv gewertet wurden (Hamilton und Timoney 1973; Fulton et al. 1982; Løken et al. 1982 b). Der Problematik über unspezifische Reaktionen bei solch geringen Verdünnungen sollte man sich bewußt sein. Dies gilt in erster Linie für Einzeltieruntersuchungen.

Da in Bayern Erkrankungen bei Schafen, Ziegen und Schweinen bedingt durch das BVD/MD-Virus bisher nicht beschrieben wurden, waren, wenn überhaupt, relativ niedrige Titer zu erwarten. Die mitgeführten Kontrollen sollten verfahrenstechnische Beeinflussungen weitgehend ausschließen, so daß eine Anfangsverdünnung der Seren von 1 : 2 zu vertreten und bei Hemmung des Testviruswachstums als spezifisch anzusehen war.

Da Blut- bzw. Serumproben aufgrund unterschiedlicher Vorberichte (z. B. Untersuchung auf verschiedene Krankheitserreger wie Aujeszkysche Krankheit, Maedi/Visna oder CAE, Export- und Quarantäneuntersuchungen) eingesandt wurden, konnte man von einer weitgehend zufälligen Auswahl ausgehen.

Dies entsprach zwar nicht voll den Regeln der Ziehung einer Stichprobe, jedoch sollte auf diese Weise ebenfalls eine ausreichende Aussagekraft der Ergebnisse erzielt werden können.

Vom BVD/MD-Virus wurden in der Literatur mehrere Stämme beschrieben ("Oregon C 24 V", "NADL" - s. o.; "MD-1" - Bögel und Voss 1964; "Osloss 2482" - Hafez 1967; "A 1138/69"- Frey und Liess 1971). Der Einsatz von zwei weltweit verwendeten BVD/MD-Virusstämmen in der vorliegenden Arbeit ("Oregon C 24 V" und "NADL") zeigte bei einheitlichen Versuchsbedingungen deutliche Unterschiede in den Titerhöhen der untersuchten und als positiv gewerteten Seren. So lagen die Titer des größten Teiles der im Suchtest positiven Seren bei Verwendung des Stammes "Oregon C 24 V" höher als bei Benutzung des Stammes "NADL". Die Durchschnittstiters waren bei den Schafen um 53,3 %, bei den Ziegen um 118,2 % und bei den Schweinen um 127,0 % höher als beim Stamm "NADL", wenn man den Stamm "Oregon C 24 V" verwandte. Dieses Ergebnis läßt auf Infektionen mit Virusstämmen schließen, die in ihrer Antigenverwandtschaft dem Stamm "Oregon C 24 V" näher stehen als dem Stamm "NADL". Es stellt sich hier sogar die Frage, ob eine Verbindung zwischen dem Einsatz von BVD/MD-Lebendvakzinen für das Rind, die als Virus einen attenuierten "Oregon"-Stamm enthalten, und dem vorliegenden Ergebnis bestehen könnte. Dazu liegen jedoch keine ausreichenden Angaben über Ausscheidung und antikörperbildende Potenz des Impfvirus bei Nicht-Rindern vor.

Die Möglichkeit, daß BVD/MD-Titer nach Kontakt mit geimpften Rindern entstünden, diskutierten bereits Stewart et al. (1971) bei Schweinen. Den Vorberichten zu den für die vorliegende Arbeit verwandten Seren war jedoch nicht zu entnehmen, ob Kontakt zwischen geimpften Rindern und Schweinen, Schafen oder Ziegen bestand.

Die niedrigen Titer bei dieser Untersuchung (73,2 % lagen mit dem Stamm "Oregon C 24 V" unter oder bei 1 : 4, 93,0 % mit dem Stamm "NADL" - ohne die 25 bei der Verdünnung von 1 : 2

negativen Seren) deuten entweder auf Infektionen, die schon längere Zeit zurückliegen hin oder auf eine schwache Stimulierung des Immunsystems. Für letztere Möglichkeit spricht, daß bei Schafen und Schweinen nach oraler oder nasaler Inokulation bzw. nach "in-Kontakt-Versuchen" ebenfalls nur geringe Titer festgestellt wurden (Bögel 1964; Fernelius et al. 1973 a, b; Barlow et al. 1980; Terpstra 1981).

Der Stamm "Oregon C 24 V" war in der vorliegenden Untersuchung für den Neutralisationstest zum Nachweis von BVD/MD-Antikörpern geeigneter als der Stamm "NADL", da auch Probanden mit geringen Titern erfaßt wurden. Die engere antigene-tische Verwandtschaft des "NADL"-Stammes zu den ESP-Stämmen "Alfort" und "331" (Liess et al. 1976; Neukirch et al. 1980) hätte bei den Untersuchungen von Schweineseren im umgekehrten Falle zu erheblichen Diskussionen über das infizierende Virus führen können. Dies möge an einem Beispiel aus dieser Arbeit verdeutlicht werden: Ein Schweineserum reagierte im NIF-Test gegen ESP-Virus positiv mit einem Titer von 1 : 10. Der Titer mit dem BVD/MD-Virusstamm "NADL" lag bei 1 : 6 und der mit dem Stamm "Oregon C 24 V" bei 1 : 24. Durch das Ergebnis des Neutralisationstests mit dem Stamm "NADL" alleine wäre eine Abgrenzung zu einer Infektion mit ESP-Virus nicht möglich gewesen.

In der Bundesrepublik Deutschland beschrieben bisher nur Liess et al. (1982) einen BD-Ausbruch in zwei Schafherden Nordwestdeutschlands (Landkreise Friesland und Wesermarsch). Das Auftreten von Antikörpern gegen BVD/MD-Virus bei Schafen und Ziegen in Nordbayern ohne das Bekanntwerden klinischer Erscheinungen kann als Hinweis auf eine vielfach inapparente Verlaufsform der BVD/MD-Infektion bei diesen Tierarten gelten.

Ähnliches trifft sicherlich für das Schwein zu, wobei hier jedoch das klinische Krankheitsbild einer BVD/MD-Infektion noch nicht hinreichend bekannt ist (Stewart et al. 1971; Phillip und Darbyshire 1972; Fernelius et al. 1973 a, b;

Derbyshire 1975; Wrathall et al. 1978).

Wie jüngere Arbeiten zeigen, stellt die Verbreitung des BVD/MD-Virus durch immuntolerante Ausscheider unter Schafen und Schweinen einen bedeutenden Faktor dar, wobei diese Tiere als wichtigstes Virusreservoir betrachtet werden müssen (Stewart et al. 1971, 1980; Hamilton und Timoney 1972, 1973; Fernelius et al. 1973 a; Gard et al. 1976; Plant et al. 1976 a, b, 1977; Sawyer et al. 1983). Andere Verbreitungsmöglichkeiten, so vor allem durch wildlebendes Reh- und Rotwild, das auf den gleichen Weiden äst wie Rinder- und Schafherden, wurden diskutiert (Romváry 1965). Inwieweit dem Schwarzwild und kleinen Nagetieren (Wildhasen, Mäuse, Wildkaninchen) epidemiologische Bedeutung zukommt, ist fraglich, da bisher keine Untersuchungsergebnisse über die BVD/MD-Virusausscheidung nach experimenteller oder natürlicher Infektion vorliegen.

Um Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen Verwerfensfällen und BVD/MD-Virusinfektionen zu ziehen, war die Anzahl der zur Abklärung der Abortursache eingesandten Seren zu gering. Aufgrund der geringen Verbreitung von Antikörpern scheint jedoch das BVD/MD-Virus bei Aborten der untersuchten Tierarten in Nordbayern keine große Rolle zu spielen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Lamontagne und Roy (1984) in Kanada. Demnach treten erhebliche Verluste nur nach Neueinschleppung in eine Herde auf.

4.2. Schaf und Ziege:

Vergleicht man die Literatur bezüglich serologischer Untersuchungen über BVD/MD-Virusinfektionen bei Schafen (Bögel 1964; French und Snowden 1964; St. George 1971; Becker 1983) mit dem hier vorliegenden Ergebnis, fallen vor allem die geringen Titerhöhen auf. So reichen sie bei French und Snowden (1964) bis 1 : 1000, bei St. George (1971) über 1 : 270 und bei Becker (1983) bis 1 : 640, wobei sie in dieser Untersuchung mit wenigen Ausnahmen unter 1 : 32 lagen. Hieraus

läßt sich der Schluß ziehen, daß neben versuchstechnischen Unterschieden, wie z. B. die verwandte Zellkultur oder das Testvirus, sicherlich in der geringen Verbreitung des BD-Virus in Nordbayern der Hauptgrund zu suchen ist. Dies wird durch das Fehlen klinischer, virologischer und serologischer Berichte indirekt bestätigt.

Mit 20,1 % positiver Reagenten liegt das hiesige Ergebnis etwa in der Mitte des Bereichs bisheriger Daten serologischer Untersuchungen, die von 8,2 % (St. George 1971) über 16 % (French und Snowdon 1964) und 37,6 % (Bögel 1964) bis 60,3 % (Becker 1983) reichen. Zieht man in Betracht, daß Bögel (1964) keinen Grenztiter einsetzte und bei den vorliegenden Ergebnissen ein solcher von $\geq 1 : 2$ festgelegt wurde, so liegen diese beiden im süddeutschen Raum gewonnenen Infektionsraten relativ nahe zusammen und deutlich unter den Resultaten in Hessen.

Bei den Ziegen kann man im großen und ganzen von den gleichen Verhältnissen wie beim Schaf ausgehen. Unterschiede wird es lediglich in der Epidemiologie geben. Aufgrund der anderen Haltungsform (meist "stationäre" Weidewirtschaft ohne großen Tieraustausch) im Vergleich zu Schafen (Wanderherden, wobei häufig mehrere Herden zusammengetrieben werden) kommt eine Übertragung durch infizierte Rinder oder durch den Kontakt mit einer infizierten Herde kaum in Frage. Vielmehr sollte man dem Neuzukauf inapparent infizierter Tiere größere Bedeutung beimessen.

4.3. Schwein:

Beim Schwein stellt sich das Geschehen um die BVD/MD-Virusinfektion anders als bei Schaf und Ziege dar, da es offensichtlich nicht zu den bei diesen beiden Tierarten beschriebenen klinischen Erkrankungen kommt. Hier rückt die verwandtschaftliche Beziehung des BVD/MD-Virus zum ESP-Virus in den Vordergrund.

Es ist daher zu fordern serologisch ESP-positive Tiere zur Abklärung der Herkunft der Antikörper auch auf BVD/MD-Virus-neutralisierende Antikörper zu untersuchen um falsch-positive Ergebnisse mit den entsprechenden Konsequenzen auszuschließen (Carbrey et al. 1976; Brüske 1980).

Für die Epidemiologie spielen inapparent infizierte Tiere eine ebenso wichtige Rolle wie bei den Schafen und Ziegen ("Carrier"-Tiere; Fernelius et al. 1973 a, b). Aufgrund der intensiven Schweinehaltung in abgeschlossenen Ställen kommen für die Verbreitung der Infektion überwiegend Carrier-Schweine in Frage, welche als intrauterin infizierte Ferkel oder als nicht als infiziert erkannte Muttersauen zugekauft werden. Die Bedeutung der Eber nimmt mit der Zunahme der künstlichen Besamung schrittweise ab. Jedoch sollte dafür in den Eberstationen eine BVD/MD-Virusinfektion nicht außer Acht gelassen werden, da die Übertragung durch den Samen beim Schwein noch nicht nachgewiesen, aber wohl durchaus möglich ist.

Solange nicht bekannt ist, welche wirtschaftlichen Verluste eine BVD/MD-Virusinfektion in einem Schweinebestand nach sich zieht, sollte in den nächsten Jahren dem Krankheitsbild dieser Virusinfektion und dessen Konsequenzen mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden.

5. Zusammenfassung:

In einer serologischen Übersichtsuntersuchung wurden 865 Schweine-, 627 Ziegen- und 497 Schafseren auf Antikörper gegen den Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease-(BVD/MD)-Virusstamm "Oregon C 24 V" getestet. Im Neutralisationstest auf Mikrotiterplatten reagierten bei einer Serumverdünnung von 1 : 2 34 Schweine ($\hat{=}$ 3,9 %), 19 Ziegen ($\hat{=}$ 3,0 %) und 100 Schafe ($\hat{=}$ 20,1 %) positiv. Sechs Pferde- und zwei Steinbockseren, sowie je eine Serumprobe einer Nilgau- und einer Mendesantilope, die zusätzlich untersucht werden konnten, reagierten hierbei negativ.

Bei der anschließenden Titration der oben beschriebenen positiven Seren vergleichend mit den beiden BVD/MD-Virusstämmen "Oregon C 24 V" und "NADL" zeigte sich, daß die Mehrzahl der Neutralisationstiter bei Verwendung des Stammes "Oregon C 24 V" unter 1 : 8 lag; Bei Verwendung des Stammes "NADL" lagen die meisten Titer unter 1 : 4. Aufgrund der durchschnittlich höheren Neutralisationstiter beim Einsatz des BVD/MD-Virusstammes "Oregon C 24 V" wurde darauf geschlossen, daß beim Infektionsgeschehen der BVD/MD in Nordbayern vor allem Virusstämme beteiligt sind, die dem Stamm "Oregon C 24 V" näher stehen als dem Stamm "NADL".

Bei einem Schweineserum kam es im Neutralisations- und Immunofluoreszenztest (NIF-Test) zur Kreuzreaktion mit dem Europäischen Schweinepest-Virusstamm "Alfort", was bei alleiniger Verwendung des BVD/MD-Virusstammes "NADL" zu diagnostischen Schwierigkeiten geführt hätte.

Eine gewisse Konzentration des BVD/MD-Infektionsgeschehens bei den untersuchten Tierarten in erster Linie auf Mittel- aber auch auf Unterfranken ist bei Betrachtung der räumlichen Verteilung zu erkennen.

Beziehungen zwischen Verwerfensfällen und BVD/MD-positiven

Tieren konnten nicht nachgewiesen werden.

Summary:

SEROLOGICAL SURVEY FOR THE EVIDENCE OF BVD/MD-VIRUS-INFECTION
IN NOT-CATTLES ALL OVER NOTHERN BAVARIA

In a serological survey 865 swine, 627 goat, and 497 sheep sera were tested for antibodies against Bovine Virusdiarrhea/ Mucosal Disease (BVD/MD) virus strain "Oregon C 24 V". 34 swine ($\hat{=}$ 3,9 %), 19 goats ($\hat{=}$ 3,0 %), and 100 sheep ($\hat{=}$ 20,1 %) showed a positive reaction in the neutralization test (NT) at a serum dilution of 1 : 2. In sera of six horses, two ibexes, one nilgai, and one addax no antibodies against BVD/ MD virus were detected.

For the titration of the positive sera two BVD/MD virus strains, "Oregon C 24 V" and "NADL", were used. With "Oregon C 24 V" strain most of the neutralization titers were below 1 : 8; with "NADL" strain most of the titers were below 1 : 4. Because of the higher average of neutralization titers using BVD/MD virus strain "Oregon C 24 V" it was concluded that mostly virus strains which are more related to strain "Oregon C 24 V" than to strain "NADL" are involved in the infection of BVD/MD in Nothern Bavaria.

In the neutralization and immunofluorescence test (NIF test) one swine serum showed cross reaction to Swine Fever virus strain "Alfort". This could have led to diagnostic failure when using only the strain "NADL" of BVD/MD virus.

When looking at the distribution of BVD/MD positive sera all over Nothern Bavaria a certain concentration to Middle and Lower Franconia could be seen.

No relationship between the occurrence of abortions and BVD/ MD positive animals could be detected.

6. Lösungen und Medien:

6.1. Phosphate Buffered Saline (PBS-Lösung) pH 7,5:

NaCl	8 000 mg
KCl	200 mg
KH_2PO_4	120 mg
Na_2HPO_4 (anhyd.)	910 mg
Aqua bidest.	1 000 ml

6.2. Antibiotika-PBS-Lösung (AB-PBS-Lösung):

Penicillin (Höchst, Frankfurt)	200 000 IE
Dihydrostreptomycin (Sokro-Strepto-"S" ^R , Heyl, Berlin)	200 mg
Amphotericin B (von Heyden, München)	10 mg
PBS-Lösung	1 000 ml

6.3. PBS-Trypsin-Lösung (0,25 %-ig):

Trypsin (Biochrom, Berlin)	2 500 mg
PBS-Lösung	1 000 ml

6.4. Trypsin-Versen-haltige Salzlösung (STV-Lösung):

NaCl	8 000 mg
KCl	200 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	1 150 mg
KH_2PO_4	200 mg
EDTA- Na_2	200 mg
Trypsin	500 mg
Aqua bidest.	1 000 ml

6.5. Hanks-Lösung:

NaCl	8 000 mg
KCl	400 mg
CaCl_2	140 mg
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	100 mg

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	60 mg
KH_2PO_4	60 mg
NaHCO_3	350 mg
Glucose	1 000 mg
Aqua bidest.	1 000 ml

6.6. Laktalbuminhydrolysat-Lösung (LAH-Lösung):

LAH (Merck, Darmstadt)	50 g
Hanks-Lösung (ohne NaHCO_3)	1 000 ml

6.7. Eagles Minimal Essential Medium (MEM):

mit Earles Salzlösung

l-Arginin-HCl	105 mg
l-Cystin	24 mg
l-Histidin-HCl	31 mg
l-Isoleucin	52 mg
l-Leucin	52 mg
l-Lysin-HCl	58 mg
l-Methionin	15 mg
l-Phenylalanin	32 mg
l-Threonin	48 mg
l-Tryptophan	10 mg
l-Tyrosin	36 mg
l-Valin	46 mg
Cholinchlorid	1,00 mg
Folsäure	1,00 mg
Isoinositol	1,00 mg
Nicotinamid	1,00 mg
Pantothensäure	1,00 mg
Pyridoxal-HCl	1,00 mg
Thiamin-HCl	1,00 mg
Riboflavin	0,10 mg
NaCl	6 800 mg
KCl	400 mg
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	140 mg
NaHCO_3	2 000 mg

CaCl ₂	200 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg
Glucose	1 000 mg
l-Glutamin	292 mg
Phenolrot	20 mg
Aqua bidest.	1 000 ml

6.8. Anzuchtmedium (AZM) bzw. Erhaltungsmedium (EHM):

LAH-Lösung	100 ml
NEAA (not essential amino acids; Biochrom, Berlin)	5 ml
Penicillin	125 000 IE
Dihydrostreptomycin	125 mg
Amphotericin B	1 mg
MEM	ad 1 000 ml
mit 450 mg NaHCO ₃ bzw. mit 850 mg NaHCO ₃	

6.9. Na₂CO₃/NaHCO₃-Puffer (pH 9) zum Eindeckeln:

0,6 g Na₂CO₃ in 60 ml
Aqua bidest. lösen und mischen
3,7 g NaHCO₃ in 10 ml
ad 1 000 ml Aqua bidest.

(aus Mayr et al. 1974)

7. Abkürzungen:

AB-PBS-Lösung	- Antibiotikaversetzte und phosphatgepufferte physiologische Salzlösung
AK	- Antikörper
AZM	- Anzuchtmedium
BD	- Border Disease
BEL	- Bovine embryonale Lungenzellen
BVD/MD	- Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease
CAE	- Caprine Arthritis Encephalitis
DMSO	- Dimethylsulfoxid
EHM	- Erhaltungsmedium
EHV 1	- Equines Herpesvirus 1
ESP	- Europäische Schweinepest
FKS	- Fötales Kälberserum
KBR	- Komplement-Bindungs-Reaktion
KID ₅₀	- 50 %-ige kulturinfektiöse Dosis
LA	- Laktalbumin
NIF-Test	- Neutralisations- und Immunofluoreszenztest
NKS	- Neugeborenen Kälberserum
NT	- Neutralisationstest
PBS-Lösung	- Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung
PK ₁₅ -LA	- Schweinenierenzellstamm (pig kidney 15) in LA-haltigem Medium passiert
RNS-Virus	- Ribonukleinsäurehaltiges Virus
STV-Lösung	- physiologische Salzlösung mit Trypsin und Versen (EDTA)
U/Min.	- Umdrehungen pro Minute
ZNS	- Zentrales Nervensystem
zpe	- Zytopathogener Effekt

8. Literaturverzeichnis:

- Acland H. M.; Gard G. P.; Plant J. W. (1972):
Infection of sheep with a Mucosal Disease Virus.
Austr. Vet. J., 48, 70
- Adair B. M.; McFerran J. B.; McKillop E. R.; McCullough S. J.
(1984): Survey for antibodies to respiratory viruses in
two groups of sheep in Northern Ireland.
Vet. Rec., 115, 403-406
- Aynaud J. M.; Rigaud C.; Le Turdu Y.; Galicher C.; Lombard J.;
Corthier G.; Laude H. (1974): Peste porcine classique:
les variations sérologiques du virus en France et leur
rôle dans l'évolution de la maladie sous sa forme sub-
clinique ou chronique sur le terrain.
Ann. Rech. Vét., 5, 57-85
- Baker J. A. (1962):
Bovine Virus Diarrhea Vaccine for protection of pigs
against Hog Cholera.
J. Am. Vet. Med. Assoc. (J. A. V. M. A.), 141, 1456-1457
- Baker J. A.; Coggins L.; Robson D.; Sheffy B. E.; Volenec F.
J. (1969): A possibility of decreasing the cost of Hog
Cholera eradication with use of a heterotypic BVD vac-
cine. J. A. V. M. A., 155, 1866-1873
- Barlow R. M. (1972 a):
Experiments in BD: IV. Pathological changes in ewes.
J. Comp. Path., 82, 151-157
- Barlow R. M. (1972 b):
BD of sheep: the diagnostic significance of medullated
wool fibre scores and counts of glial cells in the spi-
nal cord. Res. Vet. Sci., 13, 236-240
- Barlow R. M.; Dickinson A. G. (1965):
On the pathology and histochemistry of the central ner-
vous system in BD of sheep. Res. Vet. Sci., 6, 230-237
- Barlow R. M.; Gardiner A. C. (1969):
Experiments in BD: I. Transmission, pathology and some
serological aspects of the experimental disease.
J. Comp. Path., 79, 397-405
- Barlow R. M.; Gardiner A. C.; Nettleton P. F. (1983):
The pathology of a spontaneous and experimental MD-like
syndrome in sheep recovered from clinical BD.
J. Comp. Path., 93, 451-461
- Barlow R. M.; Gardiner A. C.; Storey I. J.; Slater J. S.
(1970): Experiments in BD: II. Some aspects of the
disease in the foetus. J. Comp. Path., 80, 635-643
- Barlow R. M.; Patterson D. S. P. (1982):
BD of sheep: a virus-induced teratogenic disorder.
Advances in Vet. Med., 36, Verlag Paul Parey, Berlin/
Hamburg (Beiheft zum "Zbl. Vet. Med.")

- Barlow R. M.; Rennie J. C.; Keir W. A.; Gardiner A. C.; Vantsis J. T. (1975): Experiments in BD: VII. The disease in goats. J. Comp. Path., 85, 291-297
- Barlow R. M.; Storey I. J. (1977 a):
Myelination of the ovine CNS with special reference to BD. I. Qualitative aspects. Neuropath. and Applied Neurobiol., 3, 237-253
- Barlow R. M.; Storey I. J. (1977 b):
Myelination of the ovine CNS with special reference to BD. II. Quantitative aspects. Neuropath. and Applied Neurobiol., 3, 255-265
- Barlow R. M.; Suttle N. F.; Derbyshire M. B.; Gardiner A. C.; Rennie J. C. (1976): Coppermetabolism in experimental BD. Vet. Rec., 98, 86-88
- Barlow R. M.; Vantsis J. T.; Gardiner A. C.; Linklater K. A. (1979): The definition of BD: Problems for the diagnostician. Vet. Rec., 104, 334-336
- Barlow R. M.; Vantsis J. T.; Gardiner A. C.; Rennie J. C.; Herring J. A.; Scott F. M. M. (1980): Mechanisms of natural transmission of BD. J. Comp. Path., 90, 57-65
- Barrett M. W.; Chalmers G. A. (1975):
A serological survey of pronghorns in Alberta and Saskatchewan. J. Wildl. Dis., 11, 157-163
- Beckenhauer W. M. H.; Brown A. L.; Lidoph A. A.; Norden C. J. Jun. (1961): Immunization of swine against Hog Cholera with a bovine Enterovirus. Vet. Med., 56, 108-112
- Becker H.-A. (1983):
Serologische und virologische Untersuchungen an nordhessischen Schafherden unter besonderer Berücksichtigung der Erkrankungen des Respirationstraktes.
Inaug. Diss., Justus-Liebig-Universität, Gießen
- Behlert C. (1979):
Immobilisation und Krankheiten der Hirsche.
Inaug. Diss., FU Berlin
- Bell M. (1967):
The problem of fuzzy lambs. Nat. Wool Grower, 57, 6
- Bernard G.; Bourdin P. (1971):
Etat immunitaire actuel, naturel ou acquis du cheptel sénégalais vis-à-vis de la peste bovine, de la maladie des muqueuses, de la rhinotrachéite infectieuse et de la maladie respiratoire à virus parainfluenza III.
Rev. Élevage Méd. Vét. Pays Trop., 24, 183-189
- Bögel K. (1964):
Über die Verbreitung eines Virus der MD-Gruppe in Schafherden Süddeutschlands. Zbl. Vet. Med. B, 11, 687-692
- Bögel K.; Voss H. J. (1964):
Serologische Untersuchungen über die Verbreitung des an der MD beteiligten Virus in Norddeutschland.
Zbl. Vet. Med. B, 11, 181-189

- Brass W.; Schulz L.-Cl.; Ueberschär S. (1966):
Über das Auftreten von "MD"-ähnlichen Erkrankungen bei
Zoo-wiederkäuern. DTW, 73, 155-158
- Brüske R. (1980):
Vergleichende serologische Untersuchungen zum Nachweis
neutralisierender AK gegen das Virus der ESP und gegen
das Virus der BVD in Blutseren von Schweinen aus fer-
kelerzeugenden Betrieben Niedersachsens.
Inaug. Diss., TH Hannover
- Brugère-Picoux J.; Maes H.; Moussa A.; Russo P.; Parodi A.
L. (1984): Identification de la "BD" ou "Maladie de la
frontière" chez le mouton en France.
Bull. Acad. Vét. de France, 57, 555-562
- Carbrey E. A.; Stewart W. C.; Kresse J. I.; Snyder M. L.
(1976): Natural infection of pigs with BVD-Virus and
its differential diagnosis from Hog Cholera.
J. A. V. M. A., 169, 1217-1219
- Carter H. B.; Terlecki S.; Shaw I. G. (1972):
Experimental BD of sheep: Effect of infection on pri-
mary follicle differentiation in the skin of Dorset Horn
lambs. Brit. Vet. J., 128, 421-427
- Castrucci G.; Torlone V.; Cilli V.; Titoli F. (1970):
Relationship between BVD-Virus and Hog Cholera Virus.
Note II: Protection test in swine and bovine using a
virulent strain of Hog Cholera Virus and the strain
TV M2 of BVD-Virus isolated in Italy.
Atti della Società Ital. delle Sci. Vet., 24, 584-587
- Castrucci G.; Torlone V.; Cilli V.; Titoli F.; Valente C.
(1973): Immunologic relationship between BVD-Virus and
Hog Cholera Virus. The influence of the strain of Hog
Cholera Virus on cross immunity tests carried out in
swine. Atti della Soc. Ital. delle Sci. Vet., 27, 627-628
- Centraal Diergeneeskundig Instituut (Lelystad) (1976):
Border Disease. Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 6, 319
- Clarke G. L.; Osburn B. I. (1978):
Transmissible congenital demyelinating encephalopathy
of lambs. Vet. Path., 15, 68- 82
- Coggins L.; Seo Sh. (1963):
Serological comparison with rabbit antisera of Hog
Cholera Virus and BVD-Virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 114, 778-780
- Cork L. C.; Hadlow W. J.; Crawford T. B.; Garham J. R.;
Piper R. C. (1974): Infectious leukoencephalomyelitis
of young goats. J. Inf. Dis., 129, 134-141
- Corthier G.; Aynaud J. M. (1974):
Serological variations of Swine Fever Viruses and their
relationships with BVD-Viruses. Proc. of the 3. Internat.
Pig Vet. Soc. Cong., Lyon (France), H. C. 4

- Dalsgaard K.; Jensen M. H. (1980):
Immunological characterization of the cross-reaction glycoproteins in cells infected with either Hog Cholera Virus or BVD-Virus. Proc. Internat. Pig Vet. Soc. Cong., Copenhagen (Denmark), 131
- Darbyshire J. H. (1960):
A serological relationship between Swine Fever and MD of cattle. Vet. Rec., 72, 331
- Darbyshire J. H. (1962):
Agar gel diffusion studies with a MD of cattle. 2. A serological relationship between a MD and Swine Fever. Res. Vet. Sci., 3, 125-128
- Derbyshire M. B. (1975):
Observations on the skin of striped piglets from BD infected sows. Vet. Rec., 96, 65
- Derbyshire M. B.; Barlow R. M. (1976):
Experiments in BD: IX. The pathogenesis of the skin lesion. J. Comp. Path., 86, 557-570
- Dickinson A. G.; Barlow R. M. (1967):
The demonstration of the transmissibility of BD of sheep. Vet. Rec., 81, 114
- Dinter Z. (1963):
Relationship between BVD-Virus and Hog Cholera Virus. Zbl. f. Bkt., 188, 475-486
- Elazhary M. A. S. Y.; Silim A.; Dea S. (1984):
Prevalence of antibodies to Bovine Respiratory Syncytial Virus, Bovine Herpesvirus-1, and Bovine PI-3 Virus in sheep and goats in Quebec. Am. J. Vet. Res., 45, 1660-1662
- Emerson J. L.; Delez A. L. (1965):
Cerebellar hypoplasia, hypomyelinogenesis, and congenital tremors in pigs, associated with prenatal Hog Cholera vaccination of sows. J. A. V. M. A., 147, 47-54
- Eskildsen M.; Overby E. (1976):
Serological diagnosis of classical Swine Fever. A comparison of a modified direct complement fixation test with an immunofluorescence plaque neutralization test in the diagnosis of experimental subclinical infection. Acta vet. scand., 17, 131-141 (zit. n. Jensen 1981)
- Evermann J. F.; Faries M. A.; Niemi S. M.; Wright R. W. jr. (1981):
Pestivirus persistence and pathogenesis: comparative diagnostic aspects of BD virus of sheep and BVD virus. Proc. Ann. Meeting Am. Ass. Vet. Lab. Diagnosticians, 24, 407-426
- Fahey K. J.; Morris B. (1978):
Humoral immune responses in foetal sheep. Immunology, 35, 651-661

- Fankhauser R.; Cravero G. C.; Fatzer R. (1974):
BD in lambs of the Swiss mountain breed.
Nuova Veterinaria, 50, 60-68
- Fay L. D. (1972):
Report to the government of Kenya on wildlife disease
research, U. N. Development Programme KEN/68/13, No.
TA 304 (zit. n. Hamblin und Hedger 1979)
- Fay L. D.; Boyce A. P. (1955):
A new disease of deer? 17. Midwest Wildl. Conf.
(zit. n. Richards et al. 1956)
- Fernelius A. L.; Amtower W. C.; Lambert G.; McChurkin A. W.;
Matthews P. J. (1973 a): BVD Virus in swine: Character-
istics of virus recovered from naturally and experimen-
tally infected swine. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 37,
13-20
- Fernelius A. L.; Amtower W. C.; Malmquist W. A.; Lambert G.;
Matthews P. J. (1973 b): BVD Virus in swine: Neutrali-
zing antibody in naturally and experimentally infected
swine. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 37, 96-102
- Fraser G. C.; Littlejohns J. R.; Moyle A. (1981):
The isolation of a probable pestivirus from a goat.
Austr. Vet. J., 57, 197-198
- French E. L.; Hore D. E.; Snowdon W. A.; Parsonson J. M.;
Uren J. (1974): Infection of pregnant ewes with MD
Virus of ovine origin. *Austr. Vet. J.*, 50, 45-54
- French E. L.; Snowdon W. A. (1964):
MD in Australian cattle. *Austr. Vet. J.*, 40, 99-105
- Frey H.-R.; Liess B. (1971):
Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zyto-
pathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Unter-
suchungen mit der Mikrotiter-Methode.
Zbl. Vet. Med. B, 18, 61-71
- Friend M.; Halterman L. G. (1967):
Serologic survey of two deer herds in New York State.
Bull. Wildl. Dis. Ass. 3, 32-34
- Fulton R. W.; Downing M. M.; Hagstad H. V. (1982):
Prevalence of Bovine Herpesvirus-1, BVD, Parainfluenza-3,
Bovine Adenoviruses-3 and -7, and Goat Respiratory Syn-
cytial Viral antibodies in goats.
Am. J. Vet. Res., 43, 1454-1457
- Gard G. P.; Acland H. M.; Plant J. W. (1976):
A MD Virus as a cause of abortion, hairy birth coat and
unthriftiness in sheep: 2. Observations on lambs survi-
ving for longer than 7 days. *Austr. Vet. J.*, 52, 64-68
- Gardiner A. C. (1967):
Foetal production of 7 s gamma globulin in experimental
and natural BD. *Vet. Rec.*, 81, 116

- Gardiner A. C.; Barlow R. M. (1972):
Experiments in BD: III. Some epidemiological considerations with reference to the experimental disease.
J. Comp. Path., 82, 29-35
- Gardiner A. C.; Barlow R. M. (1981):
Vertical transmission of BD infection.
J. Comp. Path., 91, 467-470
- Gardiner A. C.; Barlow R. M.; Rennie J. C.; Keir W. A. (1972):
Experiments in BD: V. Preliminary investigations on the nature of the agent. J. Comp. Path., 82, 159-161
- Gardiner A. C.; Nettleton P. F.; Barlow R. M. (1983):
Virology and immunology of a spontaneous and experimental MD-like syndrome in sheep recovered from clinical BD.
J. Comp. Path., 93, 463-469
- Gardiner A. C.; Zakarian B.; Barlow R. M. (1980):
Periarthritis in experimental BD of sheep: III. Immunopathological observations. J. Comp. Path., 90, 469-474
- Gibbons D. F.; Winkler C. E.; Shaw I. G.; Terlecki S.; Richardson C.; Done J. T. (1974): Pathogenicity of the BD agent for the bovine foetus. Brit. Vet. J., 130, 357-360
- Gillespie J. H.; Baker J. A.; McEntee K. (1960):
A cytopathogenic strain of Virus Diarrhea Virus.
Cornell Vet., 50, 73-79
- Guenther S. E. (1954):
An epizootic among white-tailed deer.
unveröffentlicht, Washington Department of Game (zit. n. Richards et al. 1956)
- Gutekunst D. E.; Malmquist W. A. (1963):
Separation of a soluble antigen and infectious particles of BVD-Viruses and their relationship to Hog Cholera.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 27, 121-123
- Gutekunst D. E.; Malmquist W. A. (1964):
Complement-fixing and neutralizing antibody response to BVD and Hog Cholera antigens.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 28, 19-23
- Gutekunst D. E.; Malmquist W. A. (1965):
Soluble antigen of BVD Virus. 1. Intracellular synthesis, separation and characterization.
Archiv f. Virusforschung, 15, 159-168
- Hafez S. M. (1967):
Charakterisierung und Darstellung des Virus der "Virusdiarrhoe-Mucosal Disease" des Rindes (VD-Virus).
Inaug. Diss., TH Hannover
- Hamblin C.; Hedger R. S. (1979):
The prevalence of antibodies to BVD/MD Virus in African wildlife. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 2, 295-303

- Hamilton A. F.; Donnelly W. J. C. (1970):
A new condition in lambs in Ireland. *Vet. Rec.*, 86, 581
- Hamilton A. F.; Timoney P. J. (1972):
BVD Virus and "BD". *Vet. Rec.*, 91, 468
- Hamilton A. V.; Timoney P. J. (1973):
BVD/MD Virus and BD. *Res. Vet. Sci.*, 15, 265-267
- Harding J. D. J.; Done J. T.; Darbyshire J. H. (1966):
Congenital tremors in piglets and their relation to
Swine Fever. *Vet. Rec.*, 79, 388-390
- Hartley W. J.; Kater J. C. (1962):
Observations on diseases of the CNS of sheep in New
Zealand. *New Zealand Vet. J.*, 10, 128-142
- Hermodsson S.; Dinter Z. (1962):
Properties of BVD-Virus. *Nature*, 194, 893-894
- Hore D. E.; Smith H. V.; Snowdon W. A.; Uren J. (1973):
An investigation of viral and bacterial agents associated with ovine perinatal mortality.
Austr. Vet. J., 49, 190-195
- Huck R. A. (1957):
Mucosal Disease complex. *J. Comp. Path.*, 67, 267-276
- Huck R. A. (1973):
Transmission of BD in goats. *Vet. Rec.*, 92, 151
- Huck R. A.; Evans D. H.; Woods D. G.; King A. A.; Stuart P. (1975):
BD of sheep. Comparison of the results of serological testing using complement fixation, immunodiffusion, neutralization and immunofluorescent techniques.
Brit. Vet. J., 131, 427-435
- Hughes L. E.; Kershaw G. F.; Shaw B. G. (1959):
"B" or Border Disease. *Vet. Rec.*, 71, 313-317
- Jackson T. A.; Osburn B. J.; Crenshaw G. L. (1972):
Experimental reproduction of hairy fleece and chorea in California lambs. *Vet. Rec.*, 91, 223-224
- Jensen M. H. (1981):
Detection of antibodies against Hog Cholera Virus and BVD Virus in porcine serum. A comparative examination using CF, PLA and NPLA assays.
Acta Vet. Scan., 22, 85-98
- Jensen M. H. (1985):
Screening for neutralizing antibodies against Hog Cholera and/or BVD Virus in Danish pigs.
Acta Vet. San., 26, 72-80
- Juhász M. (1962):
Is there an immunological relationship between the Hungarian Swine Fever Virus and one of the agents of VD of cattle? *Magyar Allatorvosok Lapja*, 17, 443-444

Kärber G. (1931):

Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer
Reihenversuche. Arch. Exp. Path. & Phar., 162, 480-483

Kahrs R.; Atkinson G.; Baker J. A.; Carmichael L.; Coggins L;
Gillespie J.; Langer P.; Marshall V.; Robson D.; Sheffy
B. (1964): Serological studies on the incidence of BVD,
IBR, Bovine Myxovirus Parainfluenza-3, and Leptospira
pomona in New York state. Cornell Vet., 54, 360-369

Kamijo Y.; Ohkuma S.-I.; Shimizu M.; Shimizu Y. (1977):
Differences in pathogenicity and antigenicity among Hog
Cholera Virus strains.
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 17, 133-140

Kast A.; Kraus M. (1968):
MKS-Impfung als auslösender Faktor einer latenten MD
im Zoo. 10. Int. Symp. Dis. Zoo. Anim., Salzburg, 175-179

Kumagai T.; Marimoto T.; Shimizu T.; Sasahara J.; Watanabe M.
(1962): Antigenetic relationship between Hog Cholera
Virus and BVD Virus as revealed by cross-neutralization.
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 2, 201-206

Lamontagne L.; Roy R. (1984):
Presence of antibodies to BVD/MD Virus (BD) in sheep
and goat flocks in Quebec.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 48, 225-227

Lawman M. J. P.; Evans D.; Gibbs E. P. J.; McDiarmid A.;
Rowe L. (1978): A preliminary survey of British deer
for antibody to some virus diseases of farm animals.
Brit. Vet. J., 134, 85-91

Lewis K. H. C.; Porter W. L.; Manktelow B. W. (1970):
Hairy shaker disease and abortion: Immunity and trans-
mission via mucous membranes. Vet. Rec., 86, 537-538

Liebermann h.; Wittmann W.; Tesmer S. (1971):
Beziehungen zwischen MD/VD und Schweinepest und ihre
Bedeutung für die Praxis. Mh. f. Vet.med., 26, 626-627

Liess B. (1980):
pers. Mitteilung, zit. n. Brüske (1980)

Liess B.; Blindow H.; Orban S.; Sasse-Patzer B.; Frey H.-R.;
Timm D. (1982): Aborte, Totgeburten, Kümmern, Lämmer-
sterben in zwei Schafherden Nordwestdeutschlands -
"BD" in der Bundesrepublik? DTW, 89, 6-11

Liess B.; Frey H.-R.; Bucksch U.; Röder B.; Frost J. (1976):
Hog Cholera viral antigens (brief review) and some re-
cent results on the relationship to envelope antigens
of BVD-MD virions. in: Studies on virus replication,
Com. of the European Communities, EUR 5451, 333-346
(zit. n. Brüske 1980)

Løken T.; Barlow R. M. (1981):
BD in Norway. Acta Vet. Scand., 22, 137-139

- Løken R.; Bjerkås I.; Hyllseth B. (1982 a):
BD in goats in Norway. Res. Vet. Sci., 33, 130-131
- Løken R.; Hyllseth B.; Larsen H. J. (1982 b):
BD in Norway. Serological examination of affected sheep
flocks. Acta Vet. Scand., 23, 46-52
- Mahnel H. (1984):
Untersuchungen über die Vermehrung von cytopathogenem
und nichtcytopathogenem BVD-Kulturvirus. II. Ultrahisto-
logische Befunde. Zbl. Vet. Med. B, 31, 261-273
- Malmquist W. A.; Fernelius A. L.; Gutekunst D. E. (1965):
Interference of BVD Virus by Hog Cholera Virus in swine
kidney cell cultures. Am. J. Vet. Res., 26, 1316-1327
- Manktelow B. W.; Porter W. L.; Lewis K. H. C. (1969):
Hairy Shaker Disease of lambs.
New Zealand Vet. J., 17, 245-248
- Markson L. M.; Terlecki S.; Shand A.; Sellers K. C.; Woods
A. J. (1959): Hypomyelinogenesis congenita in sheep.
Vet. Rec., 71, 269-271
- Matthaeus W. (1981):
Differences in reaction behaviour of structural poly-
peptides of BVD Virus with antisera against BVD Virus
and Hog Cholera Virus. Zbl. Vet. Med. B, 28, 126-132
- Matthews R. E. F. (1979):
Classification and nomenclature of viruses.
Intervirology, 12, 132-296
- Mayr A.; Bachmann P. A.; Bibrack B.; Wittmann G. (1974):
Virologische Arbeitsmethoden, Bd. I. Gustav Fischer
Verlag, Stuttgart
- McDiarmid A. (1975):
Some disorders of wild deer in the United Kingdom.
Vet. Rec., 97, 6-9
- Mehring M. (1965):
Beitrag zur Pathologie der Säugetiere zoologischer Gär-
ten. Inaug. Diss., TH Hannover
- Mengeling W. L.; Gutekunst D. E.; Fernelius A. K.; Pirtle
E. C. (1963): Demonstration of an antigenic relation-
ship between Hog Cholera and BVD Viruses by immuno-
fluorescence. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 27, 162-164
- Munday B. L. (1966):
Diseases of Tasmania's free-living animals.
Res. Bull., 5, Tasmania Department of Agriculture
(zit. n. Hamblin und Hedger 1979)
- Munday B. L. (1972):
A serological study of some infectious diseases of
Tasmanian wildlife. J. Wildl. Dis., 8, 169-175

- Nettleton P. F.; Herring J. A.; Corrigall W. (1980):
Isolation of Bovine Virus Diarrhoea Virus from a Scottish red deer. *Vet. Rec.*, 107, 425-426
- Neukirch M.; Liess B.; Frey H.-R.; Prager D. (1980):
Serologische Beziehungen zwischen Stämmen des ESP-Virus und dem Virus der BVD.
Fortschritte der Vet.med., 30, 148-153
- Neumann W.; Buitkamp J.; Beckmann G.; Plöger W. (1980):
BVD/MD-Infektion bei einem Damhirsch (Kurzmitteilung).
DTW, 87, 94
- Nott J. A.; Shaw I. G. (1967):
BD in sheep - its effect on fertility, viability and wool. *Vet. Rec.*, 80, 534-537
- Ohnacker I. (1980):
Beitrag zur vergleichenden Bewertung neutralisierender AK-Titer gegen ESP- und BVD-Virusstämme in Feldseren von Schweinen aus ESP-verdächtigen Ferkelerzeugerbetrieben Niedersachsens. Inaug. Diss., TH Hannover
- Orr M. B.; Barlow R. M. (1978):
Experiments in BD: X. The postnatal skin lesion in sheep and goats. *J. Comp. Path.*, 88, 295-302
- Osburn B. I.; Crenshaw G. L.; Jackson T. A. (1972):
Unthriftness, hairy fleece, and tremors in newborn lambs. *J. A. V. M. A.*, 160, 442-445
- Osburn B. I.; Clarke G. G.; Stewart W. C.; Sawyer M. (1973):
BD-like syndrome in lambs: antibodies to Hog Cholera and BVD-Viruses. *J. A. V. M. A.*, 163, 1165-1167
- Parks J. B.; England J. J. (1974):
A serological survey for selected viral infections of Rocky Mountains bighorn sheep.
J. Wildl. Dis., 10, 107-110
- Patterson D. S. P.; Brush P. J.; Foulkes J. A.; Sweasey D. (1974):
Copper metabolism and the composition of wool in BD. *Vet. Rec.*, 95, 214-215
- Patterson D. S. P.; Sweasey D. (1969):
Foetal immunoglobulins in experimental BD of lambs. *Vet. Rec.*, 84, 670-671
- Patterson D. S. P.; Sweasey D. (1970):
Lipid hexose: phosphorous ratio as an aid to the diagnosis of congenital myelin defects in lambs and piglets. *Acta neuropath.*, 15, 318-326
- Patterson D. S. P.; Sweasey D. (1973):
Hypocuraemia in experimental BD. *Vet. Rec.*, 93, 484-485
- Patterson D. S. P.; Terlecki S.; Done J. T.; Sweasey D.; Hebert C. N. (1971):
Neurochemistry of the spinal cord in experimental BD (Hypomyelinogenesis congenita) of lambs. *J. Neurochem.*, 18, 883-894

- Patterson D. S. P.; Terlecki S.; Foulkes J. A.; Sweasey D.; Glancy E. M. (1975): Spinal cord lipids and myelin composition in BD (Hypomyelinogenesis congenita) of lambs. *J. Neurochem.*, 24, 513-522
- Peters J. C. (1966):
MD im Rotterdamer zoologischen Garten.
8. Int. Symp. Dis. Zoo. Anim., Leipzig, 329-333
- Peters J. C. (1968):
MD im Rotterdamer zoologischen Garten.
Zool. Garten (NF), 35, 146-148
- Phillip J. I. H.; Darbyshire J. H. (1972):
Infection of pigs with BVD-Virus.
J. Comp. Path., 82, 105-109
- Physick-Sheard P. W.; Hopkins J. B.; O'Connor R. D. (1980):
A BD-like syndrome in a southern Ontario sheep flock.
Can. Vet. J., 21, 53-60
- Plant J. W.; Acland H. M.; Gard G. P. (1976 a):
A MD-Virus as a cause of abortion, hairy birth coat and unthriftiness in sheep: 1. Infection of pregnant ewes and observations on aborted fetuses and lambs dying before one week of age. *Austr. Vet. J.*, 52, 57-63
- Plant J. W.; Acland H. M.; Gard G. P.; Walker K. H. (1983):
Clinical variations of BD in sheep according to the source of the inoculum. *Vet. Rec.*, 113, 58-60
- Plant J. W.; Gard G. P.; Acland H. M. (1976 b):
A MD-Virus infection of the pregnant ewe as a cause of a BD-like condition. *Austr. Vet. J.*, 52, 247-249
- Plant J. W.; Gard G. P.; Acland H. M. (1977):
Transmission of a MD-Virus infection between sheep.
Austr. Vet. J., 53, 574-577
- Plant J. W.; Littlejohns I. R.; Gardiner A. C.; Vantsis J. T.; Huck R. A. (1973): Immunological relationship between BD, MD and Swine Fever. *Vet. Rec.*, 92, 455
- Plateau E.; Remond M.; Ursache R.; Larenaudie B. (1978):
Contribution à l'étude des incidences sérologiques de la maladie des muqueuses chez le porc en France.
Revue de Méd. Vét., 129, 1693-1703
- Plowright W. (1969):
Other diseases in relation to the J. P. 15 programme.
1. Ann. Mtg. Joint Campaign against Rinderpest (J. P. 15), Mogadiscio (zit. n. Hamblin und Hedger 1979)
- Porter W. L.; Lewis K. H. C.; Manktelow B. W. (1972):
Hairy Shaker Disease of lambs: 1. Acquired immunity, abortion and transmission via mucous membranes.
2. Further studies on acquired immunity, abortion and effects on foetal growth.
New Zealand Vet. J., 20, 1-7

- Potts B. J.; Osburn B. I.; Johnson K. P. (1982):
BD: Experimental reproduction in sheep, using a virus replicated in tissue culture.
Am. J. Vet. Res., 43, 1464-1466
- Provost A. (1968):
zit. n. Hamblin und Hedger (1979)
- Provost A.; Bögel K.; Borredon C.; Maurice Y. (1967):
La maladie des muqueuses en Afrique centrale.
Rev. Élevage Méd. Vét. Pays Trop., 20, 27-49
- Richards S. H.; Schipper I. A.; Eveleth D. F.; Shumard R. F.
(1956): MD of deer. Vet. Med., 51, 358-362
- Richardson C.; Hebert C. N.; Done J. T. (1976):
Experimental BD in sheep: dose-response effect.
Brit. Vet. J., 132, 202-208
- Robinson A. J. (1971):
Serological evidence of BVD-Virus in cattle and sheep in the South Island of New Zealand.
New Zealand Vet. J., 19, 223-224
- Roeder P. L.; Sweasey D.; Terlecki S. (1983):
BD-Virus infection of the newborn lamb.
Brit. Vet. J., 139, 129-136
- Romváry J. (1965):
Incidence of Virus Diarrhoea among roes.
Acta Vet. Hung., 15, 451-455
- St. George T. D. (1971):
A survey of sheep throughout Australia for antibody to Parainfluenza type 3 Virus and to MD-Virus.
Austr. Vet. J., 47, 370-374
- Salsbury D. L. (1985):
Challenging sheep with NY-1 strain of BVD-Virus.
Vet. Med., 80, 85-87
- Sands J. J.; Harkness J. W. (1978):
The distribution of antibodies to BD-Virus among sheep in England and Wales. Res. Vet. Sci., 25, 241-242
- Sansom B. F.; Symonds H. W.; Taylor P. J. (1979):
The transfer of copper from ewes with BD to their lambs.
J. Comp. Path., 89, 361-366
- Saunders G. C. (1977):
Development and evaluation of an enzyme-labeled antibody test for the rapid detection of Hog Cholera antibodies.
Am. J. Vet. Res., 38, 21-25
- Sawyer M.; Osburn B. I.; Potts B. (1983):
Viral persistence in tissues and body excretions of sheep infected with BD-Virus. Proc. 3. Int. Symp. World Ass. Vet. Lab. Diagnosticians, Ames, 723-724
- Seibold H. R.; Dougherty E. (1967)
Virus Diarrhea Virus - neutralizing substance in ovine and porcine serums. Am. J. Vet. Res., 28, 137-140

- Shaw I. G.; Winkler C. E.; Gibbons D. F.; Terlecki S.; Hebert C. N.; Patterson D. S. P.; Done J. T. (1969): BD of sheep: vaccination of ewes before mating. Vet. Rec., 84, 147-148
- Shaw I. G.; Winkler C. E.; Terlecki S. (1967): Experimental reproduction of hypomyelinogenesis congenita of lambs. Vet. Rec., 81, 115-116
- Sheffy B. E.; Coggins L.; Baker J. A. (1961): Protection of pigs against Hog Cholera with Virus Diarrhea Virus of cattle. Proc. 65. Ann. Meet. U. S. Livestock Sanitary Ass., Minneapolis, 347-353
- Sheffy B. E.; Coggins L.; Baker J. A. (1962): Relationship between Hog Cholera Virus and Virus Diarrhea Virus of cattle. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 109, 349-352
- Shinizu M.; Furnuchi S. (1976): Neutralizing antibodies in goat serum against the viruses of Hog Cholera and BVD. Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth., 72, 7-10
- Shope R. E.; MacNamara L. G.; Mangold R. (1955): Deer mortality/Epizootic hemorrhagic disease of deer. N. J. Outdoors, 6, 16 (zit. n. Richards et al. 1956)
- Simonyi E.; Biró J. (1967): Immunization experiments against Hog Cholera with the BVD-Virus strain Oregon C 24 V. Acta Vet. Acad. Sci. Hung., 17, 55-62
- Snowdon W. A.; French E. L. (1968): The bovine MD - Swine Fever Virus complex in pigs. Austr. Vet. J., 44, 179-184
- Snowdon W. A.; Parsonson I. M.; Broun M. L. (1975): Reaction of pregnant ewes to inoculation with MD-Virus of bovine origin. J. Comp. Path., 85, 241-251
- Spais A. G.; Papadopoulos O.; Vantsis J. T. (1975): An extensive outbreak of BD in Greece (a preliminary report). 20. World Vet. Cong., Summeries; Vol. 2, 622-623
- Sweasey D.; Patterson D. S. P.; Richardson C.; Harkness J. W.; Shaw I. G.; Williams W. W. (1979): BD: A sequential study of surviving lambs and an assessment of its effect on profitability. Vet. Rec., 104, 447-450
- Schellner H.-P. (1977): Untersuchungsergebnisse von Fallwild und anderen ausgewählten Tierarten von 1973-1976 in Bayern. Tierärztl. Umschau, 32, 225-228
- Schipper I. A.; Weiss R.; Moen R. A. (1978): Isolation of a Bovine Virus Diarrhea (BVD) Virus from a 1-week-old foal. Vet. Med. & Small Ani. Clin., 73, 786

- Schröder H.-D.; Ippen R. (1973):
Beitrag zu den virusbedingten und bakteriellen Erkrankungen der Zoowiederkäuer. 15. Int. Symp. Dis. Zoo. Anim., Kolmarden, 35-40
- Stauber E. H.; Autenrieth R.; Markham D. O.; Whitbeck V. (1980): A seroepidemiologic survey of three pronghorn (*Antilocapra americana*) populations in southeastern Idaho, 1975-1977. J. Wildl. Dis., 16, 109-115
- Steger G. (1973):
Untersuchungsergebnisse an 1500 Objekten aus der Gruppe wildlebender Wiederkäuer. 15. Int. Symp. Dis. Zoo. Anim., Kolmarden, 25-34
- Stewart W. C.; Carbrey E. A.; Jenney E. W.; Brown C. L.; Kresse B. S. (1971): BVD infection in pigs. J. A. V. M. A., 159, 1556-1563
- Stewart W. C.; Miller L. D.; Kresse J. I.; Snyder M. L. (1980): BVD infection in pregnant swine. Am. J. Vet. Res., 41, 459-462
- Storey I. J.; Barlow R. M. (1972):
Experiments in BD: VI. Lipid and enzyme histochemistry. J. Comp. Path., 82, 163-170
- Taylor W. P.; Okeke A. N. C.; Shidali N. N. (1977):
Prevalence of BVD and IBR antibodies in Nigerian sheep and goats. Trop. Anim. Hlth. & Prod., 9, 171-175
- Terlecki S. (1976):
BD: a viral teratogen of farm animals. Vet. Annual, 17, 74-79
- Terlecki S.; Hebert C. N.; Done J. T. (1973):
Morphology of experimental BD of lambs. Res. Vet. Sci., 15, 310-317
- Terlecki S.; Roeder P. L. (1983):
BD: effect of virus administered intracerebrally to newborn lambs. J. Comp. Path., 93, 243-249
- Terpstra C. (1981):
BD: virus persistence, antibody response and transmission studies. Res. Vet. Sci., 30, 185-191
- Tessler J.; Stewart W. C.; Kresse J. I.; Snyder M. L. (1977):
Tween 80: a marker for differentiation of Hog Cholera and BVD-Viruses. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 41, 127-129
- Thorsen J.; Henderson J. P. (1971):
Survey for antibody to Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), BVD and Parainfluenza 3 (PI 3) in moose sera. J. Wildl. Dis., 7, 93-95 (zit. n. Hamblin/Hedger)
- Vantsis J. T.; Barlow R. M.; Fraser J.; Rennie J. C.; Mould D. L. (1976): Experiments in BD: VIII. Propagation and properties of a cytopathic virus. J. Comp. Path., 86, 111-120

- Vantsis J. T.; Barlow R. M.; Gardiner A. C.; Linklater K. A. (1980 a): The effects of challenge with homologous and heterologous strains of BD Virus on ewes with previous experience of the disease.
J. Comp. Path., 90, 39-45
- Vantsis J. T.; Linklater K. A.; Rennie J. C.; Barlow R. M. (1979): Experimental challenge infection of ewes following a field outbreak of BD.
J. Comp. Path., 89, 331-339
- Vantsis J. T.; Rennie J. C.; Gardiner A. C.; Wells P. W.; Barlow R. M.; Martin W. B. (1980 b): Immunization against BD. J. Comp. Path., 90, 349-354
- Ward G. M. (1971):
Experimental infection of pregnant sheep with BVD-MD Virus. Cornell Vet., 61, 179-191
- Weavers E. D.; Donnelly W. J. C.; Timoney P. J. (1975):
A comparison of the effects of challenging pregnant ewes with BVD/MD Virus or a brain suspension from a lamb with BD. Irish Vet. J., 29, 161-164
- Weber A.; Paulsen J.; Krauss H. (1978):
Seroepidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von Infektionskrankheiten bei einheimischen Schalenwild. Prakt. TA, 59, 353-358
- Weber K.-H.; Hürter K.-P.; Commichau C. (1982):
Über das Vorkommen des VD/MD-Virus bei Cerviden in Rheinland-Pfalz. DTW, 89, 1-3
- Westbury H. A.; Napthine D. V.; Straube E. (1979):
BD: persistent infection with the virus.
Vet. Rec., 104, 406-409
- Wilsmore A. J.; Roeder P. L. (1984):
BD in Syria. Trop. Anim. Hlth. & Prod., 16, 225-226
- Wrathall A. E.; Bailey J.; Done J. T.; Shaw I. G.; Winkler C. E.; Gibbons D. F.; Patterson D. S. P.; Sweasey D. (1978): Effects of experimental BD-Infection in the pregnant sow. Zbl. Vet. Med. B, 25, 62-69
- Zakarian B.; Barlow R. M.; Rennie J. C. (1975):
Periarteritis in experimental BD of sheep. I. The occurrence and distribution of the lesion.
J. Comp. Path., 85, 453-460
- Zakarian B.; Barlow R. M.; Rennie J. C.; Head K. W. (1976):
Periarteritis in experimental BD of sheep. II. Morphology and histochemistry of the lesion.
J. Comp. Path., 86, 477-487

Lebenslauf:

Als zweiter Sohn von drei Kindern des Zimmermanns Herbert Holweg und seiner Ehefrau Emma Holweg, geborene Ziegler, wurde ich, Reinhard Holweg, am 17. Juli 1959 in Heroldsberg geboren.

Aufgewachsen in Heroldsberg, besuchte ich von September 1965 bis Juli 1971 die dortige Volksschule. Während der folgenden vier Jahre erreichte ich an der Veit-Stoß-Realschule in Nürnberg die Mittlere Reife. Im September 1975 trat ich in das Hardenberg-Gymnasium in Fürth/Bayern über, wo ich im Mai 1978 das Abitur ablegte.

Nach Ableistung des 15-monatigen Wehrdienstes begann ich das tierärztliche Studium im Wintersemester 1979/80, welches ich im September 1984 mit dem Staatsexamen abschloß.

Ab Januar 1985 fertigte ich am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern in Nürnberg meine Dissertation an.

Seit Dezember 1985 arbeite ich in der Kleintierpraxis von Frau Dr. Gudrun Hagmayer in Nürnberg.

Für die freundliche Überlassung des Themas und für die anfänglichen Anregungen bedanke ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Anton Mayr.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Kurt Bauer, der mir den Arbeitsplatz bereitstellte und mich während der Niederschrift des Manuskriptes hilfreich unterstützte.

Herrn Dr. Harald Singer danke ich vielmals für die fachlichen Ratschläge und für die freundschaftliche Betreuung während der Durchführung der praktischen Arbeiten.

Für die Einführung in die virologischen Techniken und die stets bereitgestellten Hilfen sei an dieser Stelle allen Technischen Assistentinnen der Virologischen Abteilung herzlich gedankt.

Herstellung: Helmut Preußler Druck + Verlag, Rothenburger Str. 25,
8500 Nürnberg 70